(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 201991804 (13) A1

# (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
**2020.02.07**

(22) Дата подачи заявки
**2018.02.01**

(51) Int. Cl. ***A61K 39/00*** (2006.01)
***A61K 39/39*** (2006.01)

## (54) ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ мРНК, КОДИРУЮЩЕЙ ПЕПТИДЫ С АКТИВИРУЮЩЕЙ ОНКОГЕННОЙ МУТАЦИЕЙ

(31) **62/453,465; 62/467,063; 62/490,523; 62/541,571**
(32) **2017.02.01; 2017.03.03; 2017.04.26; 2017.08.04**
(33) **US**
(86) **PCT/US2018/016510**
(87) **WO 2018/144775 2018.08.09**

(71) Заявитель:
**МОДЕРНАТИЭКС, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Хуан Эрик И-Чунь, Тсе Сцзе-Вах, Яковелли Джеред, МакКинни Кристин, Велиант Николас (US)**

(74) Представитель:
**Медведев В.Н. (RU)**

(57) Данное описание относится к иммуномодулирующим терапевтическим композициям мРНК, кодирующей пептид с активирующей онкогенной мутацией, и мРНК, кодирующей полипептид, который усиливает иммунные ответы на пептид с активирующей онкогенной мутацией, например мРНК, кодирующей иммуностимулятор. Данное описание также относится к способам их применения, например, для стимуляции противораковых иммунных ответов.

201991804 A1

201991804 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-558117EA/042

# ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ МРНК, КОДИРУЮЩИХ ПЕПТИДЫ С АКТИВИРУЮЩЕЙ ОНКОГЕННОЙ МУТАЦИЕЙ

## Родственные заявки

Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке США № 62/453,465, поданной 1 февраля 2017 г.; предварительной заявке США № 62/467,063, поданной 3 марта 2017 г.; предварительной заявке США № 62/490,523, поданной 26 апреля 2017 г.; и предварительной заявке США № 62/541,571, поданной 4 августа 2017 г. Полное содержание вышеупомянутых заявок включено в данный документ посредством данной ссылки.

## Уровень техники

Возможность модулировать иммунный ответ полезна в различных клинических ситуациях, включая лечение рака и патогенных инфекций, а также в усилении ответов на вакцину для обеспечения защитного иммунитета. Существует ряд терапевтических средств для модуляции функции биологических путей и/или молекул, которые вовлекаются в такие заболеваниях, как рак и патогенные инфекции. Данные средства включают, например, низкомолекулярные ингибиторы, цитокины и терапевтические антитела. Некоторые из этих средств функционируют посредством модуляции иммунных реакций у субъекта, такие как цитокины, которые модулируют активность клеток в иммунной системе, или антитела-ингибиторы иммунных контрольных точек, такие как анти-CTLA-4 или анти-PD-L1, которые модулируют регуляцию иммунных ответов.

Кроме того, вакцины уже давно используются для стимуляции иммунного ответа против антигенов патогенов, чтобы тем самым обеспечить защитный иммунитет против последующего воздействия патогенов. Совсем недавно были разработаны вакцины с использованием антигенов, обнаруженных в опухолевых клетках, чтобы тем самым усилить противоопухолевую иммунореактивность. В дополнение к антигену(ам), используемому в вакцине, другие агенты могут быть включены в вакцинный препарат или использованы в комбинации с вакцинным препаратом для дальнейшего усиления иммунного ответа на вакцину. Такие агенты, которые повышают реактивность к вакцинам, упоминаются в данной области техники как адъюванты. Примеры обычно используемых вакцинных адъювантов включают гели и соли алюминия, монофосфориллипид А, эмульсию типа «масло в воде» MF59, полный адъювант Фрейнда, неполный

адъювант Фрейнда, детергенты и сапонины растений. Данные адъюванты обычно используются с вакцинами на основе белков или пептидов. В настоящее время разрабатываются альтернативные виды вакцин, такие как вакцины на основе РНК.

В данной области техники существует потребность в дополнительных эффективных агентах, которые усиливают иммунные ответы на представляющий интерес антиген.

**Сущность изобретения**

В данном документе представлены иммуномодулирующие терапевтические композиции, включая композиции на основе липидов, такие как липидные наночастицы, которые содержат РНК (например, матричную РНК (мРНК)), которая может безопасно направлять клеточные механизмы организма для продукции ракового белка или его фрагмента, представляющего интерес, например, пептида с активирующей онкогенной мутацией. В некоторых вариантах осуществления РНК представляет собой модифицированную РНК. Иммуномодулирующие терапевтические композиции, включая композиции мРНК и/или липидные наночастицы, содержащие их, полезны для индукции сбалансированного иммунного ответа против онкологических заболеваний, включающего как клеточный, так и гуморальный иммунитет, без риска, например, возможности инсерционного мутагенеза.

Иммуномодулирующие терапевтические композиции, включая композиции мРНК и/или липидные наночастицы согласно раскрытию, могут быть использованы в различных условиях в зависимости от распространенности рака или степени, или уровня неудовлетворенных медицинских потребностей. Иммуномодулирующие терапевтические композиции, включая композиции мРНК и липидные наночастицы согласно раскрытию, могут быть использованы для лечения и/или предотвращения рака различных стадий или степеней метастазирования. Иммуномодулирующие терапевтические композиции и липидные наночастицы согласно раскрытию обладают превосходными свойствами в том смысле, что они продуцируют гораздо большие титры антител и вызывают ответные реакции раньше, чем альтернативные противораковые лекарственные препараты, включая противораковые вакцины. Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что предоставленные композиции, такие как полинуклеотиды мРНК, лучше сконструированы для получения соответствующей конформации белка при трансляции, поскольку РНК взаимодействует с природными клеточными механизмами. В отличие

от стандартных методов лечения и вакцин, которые производятся *ex vivo* и могут вызывать нежелательные клеточные ответы, РНК предоставленных композиций представляются клеточной системе более естественным образом.

В некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает иммуномодулирующую терапевтическую композицию, содержащую: одну или более мРНК, каждая из которых содержит открытую рамку считывания, кодирующую пептид с активирующей онкогенной мутацией, и, необязательно, одну или более мРНК, каждая из которых содержит открытую рамку считывания, кодирующую полипептид, который усиливает иммунный ответ на пептид с активирующей онкогенной мутацией у субъекта, причем иммунный ответ включает клеточный или гуморальный иммунный ответ, характеризующийся: (i) стимуляцией сигнального пути интерферона I типа, (ii) стимуляцией сигнального пути NFkB, (iii) стимуляцией воспалительного ответа, (iv) стимуляцией продукции цитокинов, (v) стимуляцией развития, активности или мобилизации дендритных клеток; и (vi) комбинацией любого из (i)-(v); и фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает иммуномодулирующую терапевтическую композицию, включая композиции мРНК и/или липидные наночастицы, содержащие ее, которые усиливают иммунный ответ, например, посредством стимуляции сигнального пути интерферона I типа, стимуляции сигнального пути NFkB, стимуляции воспалительного ответа, стимуляции продукции цитокинов или стимуляции развития, активности или мобилизации дендритных клеток. Усиление иммунного ответа на представляющий интерес антиген при помощи иммуностимуляторной мРНК приводит, например, к стимуляции продукции цитокинов, стимуляции клеточного иммунитета (Т-клеточных ответов), такого как антигенспецифические ответы $CD8^+$ или $CD4^+$ Т-клеток, и/или стимуляции гуморального иммунитета (В-клеточные ответы), такого как образование антигенспецифических антител.

В некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает иммуномодулирующую терапевтическую композицию, в которой активирующая онкогенная мутация представляет собой мутацию KRAS. В некоторых аспектах мутация KRAS представляет собой мутацию G12. В некоторых аспектах мутацию KRAS G12 выбирают из мутаций KRAS G12D, G12V, G12S, G12C, G12A и G12R. В некоторых аспектах

мутацию KRAS G12 выбирают из мутаций KRAS G12D, G12V и G12C. В некоторых аспектах мутация KRAS представляет собой мутацию G13. В некоторых аспектах мутация KRAS G13 представляет собой мутацию KRAS G13D. В других аспектах раскрытие обеспечивает иммуномодулирующую терапевтическую композицию, в которой активирующая онкогенная мутация представляет собой мутацию H-RAS или N-RAS.

В некоторых вариантах осуществления специалист в данной области техники выберет мутацию KRAS, подтип HLA и тип опухоли на основании приведенных в данном документе рекомендаций и подготовит вакцину на основе KRAS для терапии. В некоторых аспектах мутацию KRAS выбирают из: G12C, G12V, G12D, G13D. В некоторых вариантах осуществления подтип HLA выбирают из: A*02:01, C*07:01, C*04:01, C*07:02, HLA-A11 и/или HLA-C08. В некоторых вариантах осуществления тип опухоли выбирают из колоректального рака, рака поджелудочной железы, легкого (например, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) и эндометрия.

В некоторых вариантах осуществления мутация HRAS представляет собой мутацию в кодоне 12, кодоне 13 или кодоне 61. В некоторых вариантах осуществления мутация HRAS представляет собой мутацию 12V, 61L или 61R.

В некоторых вариантах осуществления мутация NRAS представляет собой мутацию в кодоне 12, кодоне 13 или кодоне 61. В некоторых вариантах осуществления мутация NRAS представляет собой мутацию 12D, 13D, 61K или 61R.

В некоторых аспектах раскрытие обеспечивает иммуномодулирующую терапевтическую композицию по любому из предшествующих или связанных вариантов осуществления, причем мРНК имеет открытую рамку считывания, кодирующую конкатемер из двух или более пептидов с активирующей онкогенной мутацией. В некоторых аспектах конкатемер содержит 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 пептидов с активирующей онкогенной мутацией. В некоторых аспектах конкатемер содержит 4 пептида с активирующей онкогенной мутацией.

В других аспектах данное раскрытие обеспечивает иммуномодулирующую терапевтическую композицию, содержащую: мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую конкатемер из двух или более пептидов с активирующей онкогенной мутацией, причем конкатемер содержит KRAS-пептиды с активирующей онкогенной мутацией G12D, G12V, G12C и G13D; и одну или более

мРНК, каждая из которых содержит открытую рамку считывания, кодирующую полипептид, который усиливает иммунный ответ на KRAS-пептиды с активирующей онкогенной мутацией у субъекта. В некоторых аспектах конкатемер содержит от N к C-концу G12D, G12V, G13D и G12C. В некоторых аспектах конкатемер содержит от N к C-концу G12C, G13D, G12V и G12D.

Некоторые варианты осуществления данного раскрытия обеспечивают иммуномодулирующие терапевтические композиции, которые включают мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую конкатемер из двух или более пептидов с активирующей онкогенной мутацией. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два пептидных эпитопа отделены друг от друга одним глицином. В некоторых вариантах осуществления конкатемер содержит 3-10 пептидов с активирующей онкогенной мутацией. В некоторых таких вариантах осуществления все пептидные эпитопы отделены друг от друга единичным глицином. В других вариантах по меньшей мере два пептидных эпитопа связаны непосредственно друг с другом без линкера.

В некоторых аспектах раскрытие обеспечивает иммуномодулирующую терапевтическую композицию, содержащую: 1, 2, 3 или 4 мРНК, кодирующие 1, 2, 3 или 4 пептида с активирующей онкогенной мутацией у субъекта; и одну или более мРНК, каждая из которых содержит открытую рамку считывания, кодирующую полипептид, который усиливает иммунный ответ на пептид с активирующей онкогенной мутацией у субъекта. В некоторых аспектах композиция содержит 4 мРНК, кодирующие 4 пептида с активирующей онкогенной мутацией. В некоторых аспектах 4 мРНК кодируют KRAS-пептиды с активирующей онкогенной мутацией G12D, G12V, G12C и G13D.

В некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает иммуномодулирующую терапевтическую композицию по любому из предшествующих или связанных вариантов осуществления, в которой пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 10-30, 15-25 или 20-25 аминокислот. В некоторых аспектах пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислот. В некоторых аспектах пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 25 аминокислот.

В некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает иммуномодулирующую терапевтическую композицию по любому из предшествующих или связанных вариантов осуществления, причем

мРНК, кодирующая полипептид, который усиливает иммунный ответ на пептид с активирующей онкогенной мутацией у субъекта, кодирует конститутивно активный полипептид STING человека. В некоторых аспектах конститутивно активный полипептид STING человека содержит одну или более мутаций, выбранных из группы, состоящей из V147L, N154S, V155M, R284M, R284K, R284T, E315Q, R375A, и их комбинаций.

В некоторых аспектах конститутивно активный полипептид STING человека содержит мутацию V155M (например, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, или кодируется нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 139 или 170). В некоторых аспектах конститутивно активный полипептид STING человека содержит мутации V147L/N154S/V155M. В некоторых аспектах конститутивно активный полипептид STING человека содержит мутации R284M/V147L/N154S/V155M.

В других аспектах конститутивно активный полипептид STING человека содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 1–10 и 164. В другом аспекте конститутивно активный полипептид STING человека кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в любой из SEQ ID NO: 139–148, 165, 168, 170, 201–209 и 225. В некоторых аспектах конститутивно активный полипептид STING человека содержит 3'-НТО, содержащую по меньшей мере один сайт связывания микроРНК miR-122, такой как, например, представленный в SEQ ID NO: 149.

В некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает иммуномодулирующую терапевтическую композицию по любому из предшествующих или связанных вариантов осуществления, причем мРНК, кодирующая полипептид, который усиливает иммунный ответ на пептид с активирующей онкогенной мутацией у субъекта, кодирует конститутивно активный полипептид IRF3 человека. В одном аспекте конститутивно активный полипептид IRF3 человека содержит мутацию S396D. В одном аспекте конститутивно активный полипептид IRF3 человека содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, или кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 151 или 212. В одном аспекте конститутивно активный полипептид IRF3 представляет собой полипептид IRF3 мыши, например, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:

11, или кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 150 или 211.

В некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает иммуномодулирующую терапевтическую композицию по любому из предшествующих или связанных вариантов осуществления, причем мРНК, кодирующая полипептид, который усиливает иммунный ответ на пептид с активирующей онкогенной мутацией у субъекта, кодирует конститутивно активный полипептид IRF7 человека. В одном аспекте конститутивно активный полипептид IRF7 человека содержит одну или более мутаций, выбранных из группы, состоящей из S475D, S476D, S477D, S479D, L480D, S483D, S487D и их комбинаций; делецию аминокислот 247-467; и комбинации вышеуказанных мутаций и/или делеций. В одном варианте осуществления конститутивно активный полипептид IRF7 человека содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 14-18. В одном варианте осуществления конститутивно активный полипептид IRF7 человека кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в любой из SEQ ID NO: 153-157 и 214-218.

В еще других аспектах данное раскрытие обеспечивает иммуностимуляторную мРНК, кодирующую полипептид, выбранный из группы, состоящей из MyD88, TRAM, IRF1, IRF8, IRF9, TBK1, IKKi, STAT1, STAT2, STAT4, STAT6, c-FLIP, IKKβ, RIPK1, гибрида TAK-TAB1, DIABLO, Btk, самоактивирующейся каспазы-1 и Flt3.

В некоторых аспектах раскрытие обеспечивает иммуномодулирующую терапевтическую композицию по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем композиция дополнительно содержит противораковый терапевтический агент. В некоторых аспектах композиция дополнительно содержит полипептид-ингибитор контрольной точки. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с молекулой, выбранной из группы, состоящей из PD-1, PD-L1, TIM-3, VISTA, A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, IDO, KIR и LAG3.

В других вариантах осуществления композиция дополнительно содержит сенсибилизирующий антиген. Например, в некоторых вариантах осуществления сенсибилизирующий антиген представляет собой антиген инфекционного заболевания.

В некоторых вариантах композиция не содержит стабилизирующего агента.

В некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает

иммуномодулирующую терапевтическую композицию по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем мРНК вводят в состав липидной наночастицы. В некоторых аспектах липидная наночастица имеет мольное соотношение около 20-60% ионизируемого аминолипида: 5-25% фосфолипида: 25-55% стерола; и содержит 0,5-15% ПЭГ-модифицированного липида. В некоторых аспектах ионизируемый аминолипид выбирают из группы, состоящей, например, из, 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана (DLin-KC2-DMA), дилинолеил-метил-4-диметиламинобутирата (DLin-MC3-DMA), и ди((Z)-нон-2-ен-1-ил) 9-((4-(диметиламино)бутаноил)окси)гептадеканедиоата (L319). В некоторых аспектах ионизируемый аминолипид содержит соединение любой из формул (I), (IA), (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId) и (IIe). В некоторых аспектах ионизируемый аминолипид содержит соединение формулы (I). В некоторых аспектах соединение формулы (I) представляет собой соединение 25.

В некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает иммуномодулирующую терапевтическую композицию по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем каждая мРНК содержит по меньшей мере одну химическую модификацию. В некоторых аспектах химическую модификацию выбирают из группы, состоящей из псевдоуридина, N1-метилпсевдоуридина, 2-тиоуридина, 4'-тиоуридина, 5-метилцитозина, 2-тио-1-метил-1-дезазапсевдоуридина, 2-тио-1-метилпсевдоуридина, 2-тио-5-азауридина, 2-тиодигидропсевдоуридина, 2-тиодигидроуридина, 2-тиопсевдоуридина, 4-метокси-2-тиопсевдоуридина, 4-метоксипсевдоуридина 4-тио-1-метилпсевдоуридина, 4-тиопсевдоуридина, 5-азауридина, дигидропсевдоуридина, 5-метилуридина, 5-метилуридина, 5-метоксиуридина и 2'-О-метилуридина. В некоторых аспектах химическая модификация представляет собой псевдоуридин или аналог псевдоуридина. В некоторых аспектах химическая модификация представляет собой N1-метилпсевдоуридин. В некоторых аспектах каждая мРНК содержит полностью модифицированный N1-метилпсевдоуридин.

В некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает иммуномодулирующую терапевтическую композицию, включающую композиции мРНК и композиции на основе липидов, такие как липидные наночастицы, содержащие: одну или более мРНК, каждая из которых содержит открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, и необязательно одну

или более мРНК, каждая из которых содержит открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека; и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых аспектах конститутивно активный полипептид STING человека содержит мутацию V155M. В некоторых аспектах конститутивно активный полипептид STING человека содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах конститутивно активный полипептид STING человека содержит 3'-НТО, содержащую по меньшей мере один сайт связывания микроРНК miR-122.

В некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает иммуномодулирующую терапевтическую композицию по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией выбирают из G12D, G12V, G12S, G12C, G12A, G12R и G13D. В некоторых аспектах активирующий KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией выбирают из G12D, G12V, G12C и G13D.

В некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает иммуномодулирующую терапевтическую композицию по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем мРНК содержит открытую рамку считывания, кодирующую конкатемер из двух или более KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией. В некоторых аспектах конкатемер содержит 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией. В некоторых аспектах конкатемер содержит 4 KRAS-пептида с активирующей онкогенной мутацией. В некоторых аспектах конкатемер содержит G12D, G12V, G12C и G13D. В некоторых аспектах конкатемер содержит от N к C-концу G12D, G12V, G13D и G12C. В некоторых аспектах конкатемер содержит от N к C-концу G12C, G13D, G12V и G12D.

В некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает иммуномодулирующую терапевтическую композицию по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем композиция содержит 1, 2, 3 или 4 мРНК, кодирующие 1, 2, 3 или 4 KRAS-пептида с активирующей онкогенной мутацией. В некоторых аспектах композиция содержит 4 мРНК, кодирующие 4 KRAS-пептида с активирующей онкогенной мутацией. В некоторых аспектах 4 KRAS-пептида с активирующей онкогенной мутацией содержат G12D, G12V, G12C и G13D.

В некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает

иммуномодулирующую терапевтическую композицию по любому из предшествующих или связанных вариантов осуществления, причем KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 10-30, 15-25 или 20-25 аминокислот. В некоторых аспектах KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислот. В некоторых аспектах пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 25 аминокислот.

В некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает иммуномодулирующую терапевтическую композицию по любому из предшествующих или связанных вариантов осуществления, причем мРНК имеет открытую рамку считывания, кодирующую конкатемер из двух или более KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией, и конкатемер содержит выбранную аминокислотную последовательность из группы, указанной в SEQ ID NO: 42-47, 73 и 137. В некоторых аспектах, отличающихся тем, что мРНК, кодирующая конкатемер, содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, указанной в SEQ ID NO: 129-131, 133, 138, 167, 169, 193-195 и 197-198.

В некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает иммуномодулирующую терапевтическую композицию по любому из предшествующих или связанных вариантов осуществления, причем композиция содержит 1, 2, 3 или 4 мРНК, кодирующие 1, 2, 3 или 4 KRAS-пептида с активирующей онкогенной мутацией, и при этом KRAS-пептиды с активирующей онкогенной мутацией содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, указанной в SEQ ID NO: 36-41, 72 и 125. В некоторых аспектах KRAS-пептиды с активирующей онкогенной мутацией содержат аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 39-41 и 72. В некоторых аспектах мРНК, кодирующая KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, указанной в SEQ ID NO: 126-128, 132, 190-192 и 196.

В других аспектах данное раскрытие обеспечивает иммуномодулирующую терапевтическую композицию, включая композиции мРНК и/или липидные наночастицы, содержащие их, содержащие конструкт мРНК, кодирующий по меньшей мере один мутантный антиген KRAS человека, и конститутивно активный полипептид STING человека, например, в котором мРНК ( например, модифицированная мРНК) кодирует аминокислотную последовательность, как указано в любой из SEQ ID NO: 48-71.

В некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает иммуномодулирующую терапевтическую композицию по любому из предшествующих или связанных вариантов осуществления, причем каждую мРНК вводят в состав одной и той же или разных липидных наночастиц. В некоторых аспектах каждую мРНК, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, вводят в состав одной и той же или разных липидных наночастиц. В некоторых аспектах каждую мРНК, кодирующую конститутивно активный STING человека, вводят в состав одной и той же или разных липидных наночастиц. В некоторых аспектах каждую мРНК, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, вводят в состав одной и той же липидной наночастицы, и каждую мРНК, кодирующую конститутивно активный STING человека, вводят в состав разных липидных наночастиц. В некоторых аспектах каждую мРНК, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, вводят в состав одной и той же липидной наночастицы, и каждую мРНК, кодирующую конститутивно активный STING человека, вводят в состав одной и той же липидной наночастицы, как и каждую мРНК, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией. В некоторых аспектах каждую мРНК, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, вводят в состав разных липидных наночастиц, и каждую мРНК, кодирующую конститутивно активный STING человека, вводят в состав одной и той же липидной наночастицы, как и каждую мРНК, кодирующую каждый KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией.

В некоторых аспектах раскрытие обеспечивает иммуномодулирующую терапевтическую композицию по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления, при этом иммуномодулирующую терапевтическую композицию вводят в состав липидной наночастицы, причем липидная наночастица имеет мольное соотношение около 20-60% ионизируемого аминолипида: 5-25% фосфолипида: 25-55% стерола; и содержит 0,5-15% ПЭГ-модифицированного липида. В некоторых аспектах ионизируемый аминолипид выбирают из группы, состоящей, например, из 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3] -диоксолана (DLin-KC2-DMA), дилинолеилметил-4-диметиламинобутирата (DLin-MC3-DMA) и ди((Z) -нон-2-ен-1-ил)9-((4-(диметиламино)бутаноил)окси)гептадекандиоата (L319). В некоторых аспектах ионизируемый аминолипид содержит соединение любой из формул (I), (IA), (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId) и (IIe). В некоторых аспектах ионизируемый аминолипид

содержит соединение формулы (I). В некоторых аспектах соединение формулы (I) представляет собой соединение 25.

В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица содержит Соединение 25 (в качестве ионизируемого аминолипида), DSPC (в качестве фосфолипида), холестерин (в качестве стерола) и ПЭГ-DMG (в качестве ПЭГ-модифицированного липида). В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица имеет мольное соотношение около 20-60% Соединения 25: 5-25%, DSPC: 25-55% холестерина; и содержит 0,5-15% ПЭГ-DMG. В одном варианте осуществления липидная наночастица имеет мольное соотношение около 50% Соединения 25: около 10% DSPC: около 38,5% холестерина: около 1,5% ПЭГ-DMG (то есть Соединение 25: DSPC: холестерин: ПЭГ-DMG в соотношении около 50: 10: 38,5: 1,5). В одном варианте осуществления липидная наночастица имеет мольное соотношение 50% Соединения 25: 10% DSPC: 38,5% холестерина: 1,5% ПЭГ-DMG (то есть Соединение 25: DSPC: холестерин: ПЭГ-DMG в соотношении 50:10:38.5:1,5).

В некоторых аспектах раскрытие обеспечивает иммуномодулирующую терапевтическую композицию по любому из предшествующих или связанных вариантов осуществления, при этом каждая мРНК содержит по меньшей мере одну химическую модификацию. В некоторых аспектах химическую модификацию выбирают из группы, состоящей из псевдоуридина, N1-метилпсевдоуридина, 2-тиоуридина, 4'-тиоуридина, 5-метилцитозина, 2-тио-1-метил-1-дезазапсевдоуридина, 2-тио-1-метилпсевдоуридина, 2-тио-5-азауридина, 2-тиодигидропсевдоуридина, 2-тиодигидроуридина, 2-тиопсевдоуридина, 4-метокси-2-тиопсевдоуридина, 4-метоксипсевдоуридина 4-тио-1-метилпсевдоуридина, 4-тиопсевдоуридина, 5-азауридина, дигидропсевдоуридина, 5-метилуридина, 5-метилуридина, 5-метоксиуридина и 2'-О-метилуридина. В некоторых аспектах химическая модификация представляет собой псевдоуридин или аналог псевдоуридина. В некоторых аспектах химическая модификация представляет собой N1-метилпсевдоуридин. В некоторых аспектах каждая мРНК содержит полностью модифицированный N1-метилпсевдоуридин.

В некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает липидную наночастицу, содержащую: мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую конкатемер из 4 KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, причем 4 KRAS-пептиды с

активирующей онкогенной мутацией содержат мутации G12D, G12V, G12C и G13D; мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека. В некоторых аспектах конкатемер содержит от N к С-концу G12D, G12V, G13D и G12C. В некоторых аспектах конкатемер содержит от N к С-концу G12C, G13D, G12V и G12D.

В некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает липидную наночастицу по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем каждый KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислот. В некоторых аспектах каждый KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 25 аминокислот.

В некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает липидную наночастицу, содержащую: мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую конкатемер из 4 KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией, причем 4 KRAS-пептида с активирующей онкогенной мутацией содержат G12D, G12V, G12C и G13D; и при этом конкатемер содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:137; мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека. В некоторых аспектах мРНК, кодирующая конкатемер из 4-KRAS пептида с активирующей онкогенной мутацией, содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 167 или SEQ ID NO: 169. В некоторых аспектах конститутивно активный полипептид STING человека содержит мутацию V155M. В некоторых аспектах конститутивно активный полипептид STING человека содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит 3'-НТО, содержащую по меньшей мере один сайт связывания микроРНК miR-122. В некоторых аспектах мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 168, или SEQ ID NO: 170.

В других аспектах данное раскрытие обеспечивает липидную наночастицу, содержащую:

первые мРНК, содержащие открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12D;

вторую мРНК, содержащую открытую рамку считывания,

кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12V;

третью мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12C;

четвертую мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G13D; и

пятую мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека. В некоторых вариантах осуществления мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING, выбранном из группы, состоящей из 1: 1, 2: 1, 3: 1, 4: 1, 5: 1, 6: 1, 7: 1, 8: 1, 9: 1 и 10: 1. В одном варианте осуществления мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 5: 1.

В некоторых аспектах вышеуказанной липидной наночастицы каждый KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислот. В некоторых аспектах каждый KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 25 аминокислот.

В некоторых аспектах вышеуказанной липидной наночастицы KRAS-пептиды с активирующей онкогенной мутацией содержат аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 39-41 и 72. В некоторых аспектах мРНК, кодирующие KRAS-пептиды с активирующей онкогенной мутацией, содержат нуклеотидные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 126-128, 132, 190-192 и 196.

В некоторых аспектах вышеуказанной липидной наночастицы конститутивно активный полипептид STING человека содержит мутацию V155M. В некоторых аспектах конститутивно активный полипептид STING человека содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит 3'-НТО, содержащую по меньшей мере один сайт связывания микроРНК miR-122. В некоторых аспектах мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 168, или SEQ ID NO: 170.

В некоторых аспектах раскрытие обеспечивает липидную наночастицу по любому из предшествующих вариантов осуществления,

причем липидная наночастица имеет мольное соотношение около 20-60% ионизируемого аминолипида: 5-25% фосфолипида: 25-55% стерола; и содержит 0,5-15% ПЭГ-модифицированного липида. В некоторых аспектах ионизируемый аминолипид выбирают из группы, состоящей, например, из, 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана (DLin-KC2-DMA), дилинолеил-метил-4-диметиламинобутирата (DLin-MC3-DMA), и ди((Z)-нон-2-ен-1-ил) 9-((4-(диметиламино)бутаноил)окси)гептадеканедиоата (L319). В некоторых аспектах ионизируемый аминолипид содержит соединение любой из формул (I), (IA), (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId) и (IIe). В некоторых аспектах ионизируемый аминолипид содержит соединение формулы (I). В некоторых аспектах соединение формулы (I) представляет собой соединение 25.

В некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает липидную наночастицу по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем каждая мРНК содержит по меньшей мере одну химическую модификацию. В некоторых аспектах химическую модификацию выбирают из группы, состоящей из псевдоуридина, N1-метилпсевдоуридина, 2-тиоуридина, 4'-тиоуридина, 5-метилцитозина, 2-тио-1-метил-1-дезазапсевдоуридина, 2-тио-1-метилпсевдоуридина, 2-тио-5-азауридина, 2-тиодигидропсевдоуридина, 2-тиодигидроуридина, 2-тиопсевдоуридина, 4-метокси-2-тиопсевдоуридина, 4-метоксипсевдоуридина 4-тио-1-метилпсевдоуридина, 4-тиопсевдоуридина, 5-азауридина, дигидропсевдоуридина, 5-метилуридина, 5-метилуридина, 5-метоксиуридина и 2'-О-метилуридина. В некоторых аспектах химическая модификация представляет собой псевдоуридин или аналог псевдоуридина. В некоторых аспектах химическая модификация представляет собой N1-метилпсевдоуридин. В некоторых аспектах каждая мРНК содержит полностью модифицированный N1-метилпсевдоуридин.

В некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает лекарственный препарат, содержащий любую из вышеуказанных или связанных липидных наночастиц, для применения в терапии рака, необязательно с инструкциями по применению в терапии рака.

В других аспектах данное раскрытие обеспечивает первую липидную наночастицу, содержащую: мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12D; и мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный

полипептид STING человека.

В некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает вторую липидную наночастицу, содержащую: мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12V; и мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека.

В некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает третью липидную наночастицу, содержащую мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12C; и мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека.

В некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает четвертую липидную наночастицу, содержащую мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G13D; и мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека.

В некоторых аспектах вышеуказанных первой, второй, третьей и четвертой липидных наночастиц каждый KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислот. В некоторых аспектах каждый KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 25 аминокислот.

В некоторых аспектах вышеуказанных первой, второй, третьей и четвертой липидных наночастиц KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией содержит аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 39. В некоторых аспектах мРНК, кодирующая KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 126 или 190.

В некоторых аспектах вышеуказанных первой, второй, третьей и четвертой липидных наночастиц KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией содержит аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 40. В определенном аспекте мРНК, кодирующая KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 127 или 191.

В некоторых аспектах вышеуказанных первой, второй, третьей и четвертой липидных наночастиц KRAS-пептид с активирующей

онкогенной мутацией содержит аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 72. В некоторых аспектах мРНК, кодирующая KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 132 или 196.

В некоторых аспектах вышеуказанных первой, второй, третьей и четвертой липидных наночастиц, в которых KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией содержит аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 41. В некоторых аспектах мРНК, кодирующая KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 128 или 192.

В некоторых аспектах вышеуказанных первой, второй, третьей и четвертой липидных наночастиц конститутивно активный полипептид STING человека содержит мутацию V155M. В некоторых аспектах конститутивно активный полипептид STING человека содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах конститутивно активный полипептид STING человека содержит 3'-НТО, содержащую по меньшей мере один сайт связывания микроРНК miR-122. В некоторых аспектах мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 168, или SEQ ID NO: 170.

В некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает лекарственный препарат, содержащий любую из вышеуказанных или связанных липидных наночастиц, для применения в терапии рака, необязательно с инструкциями по применению в терапии рака. В некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает лекарственный препарат, содержащий любую из вышеуказанных первой, второй, третьей или четвертой липидных наночастиц, для применения в терапии рака, необязательно с инструкциями по применению в терапии рака.

В некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает лекарственный препарат, содержащий первую, вторую, третью и четвертую липидные наночастицы, для применения в терапии рака, необязательно с инструкциями по применению в терапии рака, причем:

(i) первая липидная наночастица содержит: мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12D; и мРНК, содержащую

открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека;

(ii) вторая липидная наночастица содержит: мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12V; и мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека;

(iii) третья липидная наночастица содержит: мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12C; и мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека; и

(iv) четвертая липидная наночастица содержит: мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G13D; и мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека.

В любом из вышеперечисленных или связанных аспектов данное раскрытие обеспечивает способ лечения субъекта, включающий: введение субъекту, страдающему раком, любой из предшествующих или схожих иммуномодулирующих терапевтических композиций или любой из вышеуказанных или схожих липидных наночастиц. В некоторых аспектах иммуномодулирующую терапевтическую композицию или липидную наночастицу вводят в комбинации с противораковым терапевтическим агентом. В некоторых аспектах иммуномодулирующую терапевтическую композицию или липидную наночастицу вводят в комбинации с полипептидом-ингибитором контрольной точки. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с молекулой, выбранной из группы, состоящей из PD-1, PD-L1, TIM-3, VISTA, A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, IDO, KIR и LAG3.

Предложенные в данном документе способы могут быть использованы для лечения субъекта, страдающего раком. В некоторых вариантах осуществления рак выбирают из рака поджелудочной железы, брюшины, толстой кишки, тонкой кишки, желчных путей, легкого, эндометрия, яичника, половых путей, желудочно-кишечного тракта, шейки матки, желудка, мочевыводящих путей, ободочной кишки, прямой кишки и кроветворных и лимфоидных тканей. В некоторых вариантах осуществления рак представляет

собой колоректальный рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак легкого, такой как немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ). В некоторых вариантах осуществления рак выбирают из группы, состоящей из колоректального рака, рака поджелудочной железы и рака легкого (например, НМРЛ).

Конструкт мРНК (например, ммРНК (модифицированная мРНК) ) согласно раскрытию (например, иммуностимуляторная мРНК, антигенкодирующая мРНК или их комбинация) может содержать, например, 5'-НТО, оптимизированную по кодонам открытую рамку считывания, кодирующую полипептид, 3'-НТО и 3'-хвостовую область связанных нуклеозидов. В одном варианте осуществления мРНК дополнительно содержит один или более сайтов связывания микроРНК (миРНК).

В одном варианте осуществления конструкт модифицированной мРНК согласно раскрытию является полностью модифицированным. Например, в одном варианте осуществления ммРНК содержит псевдоуридин (ψ), псевдоуридин (ψ) и 5-метилцитидин ($m^5C$), 1-метилпсевдоуридин ($m^1\psi$), 1-метилпсевдоуридин ($m^1\psi$) и 5-метилцитидин ($m^5C$), 2-тиоуридин ($s^2U$), 2-тиоуридин и 5-метилцитидин ($m^5C$), 5-метоксиуридин ($mo^5U$), 5-метоксиуридин ($mo^5U$) и 5-метилцитидин ($m^5C$), 2'-О-метилуридин, 2'-О-метилуридин и 5-метилцитидин ($m^5C$), N6-метиладенозин ($m^6A$) или N6-метиладенозин ($m^6A$) и 5-метилцитидин ($m^5C$). В другом варианте осуществления ммРНК содержит псевдоуридин (ψ), N1-метилпсевдоуридин ($m^1\psi$), 2-тиоуридин, 4'-тиоуридин, 5-метилцитозин, 2-тио-1-метил-1-дезазапсевдоуридин, 2-тио- 1-метилпсевдоуридин, 2-тио-5-азауридин, 2-тиодигидропсевдоуридин, 2-тиодигидроуридин, 2-тиопсевдоуридин, 4-метокси-2-тиопсевдоуридин, 4-метоксипсевдоуридин, 4-тио-1-метилпсевдоуридин, 4-тиопсевдоуридин, 5-азауридин, дигидропсевдоуридин, 5-метоксиуридин или 2'-О-метилуридин, или их комбинации. В еще одном варианте осуществления ммРНК содержит 1-метилпсевдоуридин ($m^1\psi$), 5-метоксиуридин ($mo^5U$), 5-метилцитидин ($m^5C$), псевдоуридин (ψ), α-тиогуанозин или α-тиоаденозин, или их комбинации. В некоторых аспектах ммРНК содержит псевдоуридин или аналог псевдоуридина. В некоторых аспектах ммРНК содержит N1-метилпсевдоуридин. В некоторых аспектах ммРНК содержит полностью модифицированный N1-метилпсевдоуридин.

В некоторых вариантах осуществления дозировка полинуклеотида РНК в иммуномодулирующей терапевтической композиции составляет 1-5 мкг, 5-10 мкг, 10-15 мкг, 15-20 мкг, 10-25 мкг, 20-25 мкг, 20-50 мкг, 30-50 мкг, 40-50 мкг, 40-60 мкг, 60-80 мкг, 60-100 мкг, 50-100 мкг, 80-120 мкг, 40-120 мкг, 40-150 мкг, 50-150 мкг, 50-200 мкг, 80-200 мкг, 100-200 мкг, 100-300 мкг, 120-250 мкг, 150-250 мкг, 180-280 мкг, 200-300 мкг, 30-300 мкг, 50-300 мкг, 80-300 мкг, 100-300 мкг, 40-300 мкг, 50-350 мкг, 100-350 мкг, 200-350 мкг, 300-350 мкг, 320-400 мкг, 40-380 мкг, 40-100 мкг, 100-400 мкг, 200-400 мкг, или 300-400 мкг на дозу. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующую терапевтическую композицию вводят субъекту путем внутрикожной или внутримышечной инъекции. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующую терапевтическую композицию вводят субъекту на нулевые сутки. В некоторых вариантах осуществления вторую дозу иммуномодулирующей терапевтической композиции вводят субъекту на двадцать первые сутки.

В некоторых вариантах осуществления дозу 25 микрограммов полинуклеотида РНК включают в иммуномодулирующую терапевтическую композицию, вводимую субъекту. В некоторых вариантах осуществления дозу 10 микрограммов полинуклеотида РНК включают в иммуномодулирующую терапевтическую композицию, вводимую субъекту. В некоторых вариантах осуществления дозу 30 микрограммов полинуклеотида РНК включают в иммуномодулирующую терапевтическую композицию, вводимую субъекту. В некоторых вариантах осуществления дозу 100 микрограммов полинуклеотида РНК включают в иммуномодулирующую терапевтическую композицию, вводимую субъекту. В некоторых вариантах осуществления дозу 50 микрограммов полинуклеотида РНК включают в иммуномодулирующую терапевтическую композицию, вводимую субъекту. В некоторых вариантах осуществления дозу 75 микрограммов полинуклеотида РНК включают в иммуномодулирующую терапевтическую композицию, вводимую субъекту. В некоторых вариантах осуществления дозу 150 микрограммов полинуклеотида РНК включают в иммуномодулирующую терапевтическую композицию, вводимую субъекту. В некоторых вариантах осуществления дозу 400 микрограммов полинуклеотида РНК включают в иммуномодулирующую терапевтическую композицию, вводимую субъекту. В некоторых вариантах осуществления дозу 300 микрограммов полинуклеотида РНК включают в иммуномодулирующую терапевтическую композицию, вводимую субъекту. В некоторых

вариантах осуществления дозу 200 микрограммов полинуклеотида РНК включают в иммуномодулирующую терапевтическую композицию, вводимую субъекту. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид РНК накапливается в 100 раз более высоком уровне в региональном лимфатическом узле по сравнению с периферическим лимфатическим узлом. В других вариантах осуществления иммуномодулирующая терапевтическая композиция является химически модифицированной, а в других вариантах осуществления иммуномодулирующая терапевтическая композиция не является химически модифицированной.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой общую дозу 1–100 мкг. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой общую дозу 100 мкг. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой дозу 25 мкг, вводимую субъекту всего один или два раза. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой дозу 100 мкг, вводимую субъекту всего два раза. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой дозу 1 мкг – 10 мкг, 1 мкг – 20 мкг, 1 мкг – 30 мкг, 5 мкг – 10 мкг, 5 мкг – 20 мкг, 5 мкг – 30 мкг, 5 мкг – 40 мкг, 5 мкг – 50 мкг, 10 мкг – 15 мкг, 10 мкг – 20 мкг, 10 мкг – 25 мкг, 10 мкг – 30 мкг, 10 мкг – 40 мкг, 10 мкг – 50 мкг, 10 мкг – 60 мкг , 15 мкг – 20 мкг, 15 мкг – 25 мкг, 15 мкг – 30 мкг, 15 мкг – 40 мкг, 15 мкг – 50 мкг, 20 мкг – 25 мкг, 20 мкг – 30 мкг, 20 мкг – 40 мкг 20 мкг – 50 мкг, 20 мкг – 60 мкг, 20 мкг – 70 мкг, 20 мкг – 75 мкг, 30 мкг – 35 мкг, 30 мкг – 40 мкг, 30 мкг – 45 мкг, 30 мкг – 50 мкг, 30 мкг – 60 мкг, 30 мкг – 70 мкг, 30 мкг – 75 мкг, которые могут быть введены субъекту всего один, или два, или более раз.

В некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает композицию (например, вакцину), содержащую мРНК, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, и мРНК, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека, причем мРНК, кодирующая KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, и мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 1: 1, 2: 1, 3: 1, 4: 1, 5: 1, 6: 1, 7: 1, 8: 1, 9: 1 , 10: 1 или 20: 1, или, альтернативно, в массовом соотношении STING: KRAS 1: 1, 1: 2, 1: 3, 1: 4, 1: 5, 1: 6, 1: 7, 1: 8, 1: 9, 1: 10 или 1: 20. В некоторых аспектах мРНК присутствуют в массовом

соотношении 5: 1 мРНК, кодирующей KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, к мРНК, кодирующей конститутивно активный полипептид STING человека (массовое соотношение KRAS: STING 5: 1 или, альтернативно, массовое соотношение STING: KRAS 1: 5). В некоторых аспектах мРНК присутствуют в массовом соотношении 10: 1 мРНК, кодирующей KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, к мРНК, кодирующей конститутивно активный полипептид STING человека (массовое соотношение KRAS: STING 10: 1 или, альтернативно, соотношение STING: KRAS 1: 10).

Другие аспекты раскрытия относятся к липидной наночастице, содержащей:

мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую конкатемер из 4 KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией, причем 4 KRAS-пептида с активирующей онкогенной мутацией содержат G12D, G12V, G12C и G13D;

мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека;

при этом мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING, выбранном из группы, состоящей из 1: 1, 2: 1, 3: 1, 4: 1, 5: 1, 6: 1, 7: 1, 8: 1, 9: 1 или 10: 1.

В некоторых аспектах раскрытие относится к липидной наночастице, содержащей:

первые мРНК, содержащие открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12D;

вторую мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12V;

третью мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12C;

четвертую мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G13D;

пятую мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека;

причем первая, вторая, третья, четвертая и пятая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING, выбранном из группы, состоящей из 1: 1, 2: 1, 3: 1, 4: 1, 5: 1, 6: 1, 7: 1, 8: 1, 9: 1 или 10: 1.

В некоторых из предшествующих и связанных аспектов конкатемер содержит от N- к С-концу G12D, G12V, G13D и G12C. В некоторых аспектах конкатемер содержит от N к С-концу G12C, G13D, G12V и G12D. В некоторых аспектах каждый KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислот. В некоторых аспектах каждый KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 25 аминокислот. В некоторых аспектах конкатемер содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 137. В некоторых аспектах мРНК, кодирующая конкатемер из 4 KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией, содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 167 или SEQ ID NO: 169. В некоторых аспектах конститутивно активный полипептид STING человека содержит мутацию V155M. В некоторых аспектах конститутивно активный полипептид STING человека содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит 3'-НТО, содержащую по меньшей мере один сайт связывания микроРНК miR-122. В некоторых аспектах мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 168, или SEQ ID NO: 170.

В некоторых из предшествующих и связанных аспектов липидная наночастица содержит мРНК, присутствующие в массовом соотношении KRAS: STING 1: 1. В некоторых аспектах мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 2: 1. В некоторых аспектах мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 3: 1. В некоторых аспектах мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 4: 1. В некоторых аспектах мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 5: 1. В некоторых аспектах мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 6: 1. В некоторых аспектах мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 7: 1. В некоторых аспектах мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 8: 1. В некоторых аспектах мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 9: 1. В некоторых аспектах мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 10: 1.

В другом аспекте данное раскрытие относится к липидной наночастице, содержащей модифицированную мРНК согласно

раскрытию. В одном варианте осуществления липидная наночастица представляет собой липосому. В другом варианте осуществления липидная наночастица содержит катионный и/или ионизируемый аминолипид. В одном варианте осуществления катионный и/или ионизируемый аминолипид представляет собой 2,2-дилинолеил-4-метиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (DLin-KC2-DMA) или дилинолеилметил-4-диметиламинобутират (DLin-MC3-DMA). В некоторых аспектах ионизируемый аминолипид содержит соединение любой из формул (I), (IA), (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId) и (IIe). В некоторых аспектах ионизируемый аминолипид содержит соединение формулы (I). В одном варианте осуществления ионизируемый аминолипид представляет собой соединение 25. В одном варианте осуществления липидная наночастица дополнительно содержит нацеливающий фрагмент, конъюгированный с наружной поверхностью липидной наночастицы.

В другом аспекте раскрытие относится к фармацевтической композиции, содержащей модифицированную мРНК согласно раскрытию или липидную наночастицу согласно раскрытию, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель.

В другом аспекте раскрытие относится к способу усиления иммунного ответа на представляющий интерес антиген(ы), включающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, композиции мРНК согласно раскрытию, кодирующей представляющий интерес антиген(ы) и полипептид, который усиливает иммунный ответ на представляющий интерес антиген(ы), или ее липидной наночастицы, или ее фармацевтической композиции, так что иммунный ответ на представляющий интерес антиген усиливается у субъекта. В одном аспекте усиление иммунного ответа у субъекта включает стимуляцию продукции цитокинов (например, ИФН-γ или ФНО-α). В другом аспекте усиление иммунного ответа у субъекта включает стимуляцию антигенспецифической активности $CD8^+$ Т-клеток, например, примирование, пролиферацию и/или выживаемость (например, увеличение популяции эффекторных Т-клеток/Т-клеток памяти). В одном аспекте усиление иммунного ответа у субъекта включает стимуляцию антигенспецифической активности $CD4^+$ Т-клеток (например, повышение активности Т-хелперов). В других аспектах усиление иммунного ответа у субъекта включает стимуляцию В-клеточных ответов (например, увеличение продукции антител).

В одном аспекте в данном документе обеспечены способы усиления иммунного ответа на пептид с активирующей онкогенной

мутацией, причем субъекту вводят два разных конструкта иммуностимуляторных мРНК (например, ммРНК) (при этом один или оба конструкта также кодируют или вводят с конструктом мРНК (например, ммРНК), который кодирует пептид с активирующей онкогенной мутацией), или одновременно, или последовательно. В одном аспекте субъекту вводят композицию иммуностимуляторной мРНК, которая стимулирует развитие или активность дендритных клеток, перед введением субъекту композиции иммуностимуляторной мРНК, которая стимулирует сигнальный путь интерферона типа I.

В других аспектах раскрытие обеспечивает способы стимуляции иммунного ответа на опухоль у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества композиции, содержащей по меньшей мере один конструкт мРНК, кодирующий опухолевый антиген(ы) и конструкт мРНК, кодирующий полипептид, который усиливает иммунный ответ на опухолевый антиген(ы), или ее липидной наночастицы, или ее фармацевтической композиции, так что иммунный ответ на опухоль стимулируется у субъекта. В одном аспекте опухоль представляет собой рак печени, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), меланому, рак шейки матки или рак головы или шеи.

В другом аспекте раскрытие обеспечивает композицию, содержащую:

(i) первую мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую конкатемер из 4 KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией, причем конкатемер содержит от N- к C-концу G12D, G12V, G13D и G12C, и

(ii) вторую мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека, при этом конститутивно активный полипептид STING человека содержит мутацию V155M,

причем первая мРНК и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING, выбранном из группы, состоящей из 1: 1, 2: 1, 3: 1, 4: 1, 5: 1, 6: 1, 7: 1, 8: 1, 9: 1 или 10: 1;

и фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых аспектах вышеуказанной композиции конкатемер из 4 KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 137. В некоторых аспектах первая мРНК, кодирующая конкатемер из 4 KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией, содержит

нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 169. В некоторых аспектах конститутивно активный полипептид STING человека содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 170. В некоторых аспектах первая мРНК содержит 5'-НТО, содержащую нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 176. В некоторых аспектах вторая мРНК содержит 5'-НТО, содержащую нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 176. В некоторых аспектах вторая мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит 3'-НТО, имеющую сайт связывания микроРНК miR-122. В некоторых аспектах сайт связывания микроРНК miR-122 содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 175. В некоторых аспектах каждая из первой мРНК и второй мРНК содержит поли(А)-хвост. В некоторых аспектах поли(А)-хвост содержит около 100 нуклеотидов. В некоторых аспектах каждая из первой и второй мРНК содержит структуру 5′-кэп 1. В некоторых аспектах каждая из первой и второй мРНК содержит по меньшей мере одну химическую модификацию. В некоторых аспектах химическая модификация представляет собой N1-метилпсевдоуридин. В некоторых аспектах первая мРНК является полностью модифицированной N1-метилпсевдоуридином. В некоторых аспектах вторая мРНК является полностью модифицированной N1-метилпсевдоуридином. В некоторых аспектах фармацевтически приемлемый носитель содержит буферный раствор.

В другом аспекте раскрытие обеспечивает композицию, содержащую:

(i) первую мРНК, содержащую нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 167, и

(ii) вторую мРНК, содержащую нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 168,

причем каждая из первой и второй мРНК является полностью модифицированной N1-метилпсевдоуридином, и

причем первая мРНК и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING, выбранном из группы, состоящей из 1: 1, 2: 1, 3: 1, 4: 1, 5: 1, 6: 1, 7: 1, 8: 1, 9: 1 или 10: 1;

и фармацевтически приемлемый носитель.

В одном аспекте вышеуказанной композиции фармацевтически

приемлемый носитель содержит буферный раствор.

В любом из предшествующих или связанных аспектов данное раскрытие обеспечивает композицию, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 1: 1.

В любом из предшествующих или связанных аспектов данное раскрытие обеспечивает композицию, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 2: 1.

В любом из предшествующих или связанных аспектов данное раскрытие обеспечивает композицию, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 3: 1.

В любом из предшествующих или связанных аспектов данное раскрытие обеспечивает композицию, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 4: 1.

В любом из предшествующих или связанных аспектов данное раскрытие обеспечивает композицию, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 5: 1.

В любом из предшествующих или связанных аспектов данное раскрытие обеспечивает композицию, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 6: 1.

В любом из предшествующих или связанных аспектов данное раскрытие обеспечивает композицию, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 7: 1.

В любом из предшествующих или связанных аспектов данное раскрытие обеспечивает композицию, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 8: 1.

В любом из предшествующих или связанных аспектов данное раскрытие обеспечивает композицию, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 9: 1.

В любом из предшествующих или связанных аспектов данное раскрытие обеспечивает композицию, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 10: 1.

В любом из предшествующих или связанных аспектов данное раскрытие обеспечивает композицию, которую вводят в состав липидной наночастицы. В некоторых аспектах липидная наночастица имеет мольное соотношение около 20-60% ионизируемого аминолипида: 5-25% фосфолипида: 25-55% стерола; и содержит 0,5-15% ПЭГ-модифицированного липида. В некоторых аспектах липидная наночастица имеет мольное соотношение около 50% соединения 25: около 10% DSPC: около 38,5% холестерина; и содержит около 1,5% ПЭГ-DMG.

В любом из предшествующих или связанных аспектов данное раскрытие обеспечивает композицию, которую составляют для внутримышечной доставки.

В некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает липидную наночастицу, содержащую:

(i) первую мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую конкатемер из 4 KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией, причем конкатемер содержит от N- к C-концу G12D, G12V, G13D и G12C; и

(ii) вторую мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека, при этом конститутивно активный полипептид STING человека содержит мутацию V155M,

причем первая мРНК и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 5: 1.

В некоторых аспектах вышеуказанной липидной наночастицы конкатемер из 4 KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 137. В некоторых аспектах первая мРНК, кодирующая конкатемер из 4 KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией, содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 169. В некоторых аспектах конститутивно активный полипептид STING человека содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 170. В некоторых аспектах первая мРНК содержит 5'-НТО, содержащую нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 176. В некоторых аспектах вторая мРНК содержит 5'-НТО, содержащую нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 176. В некоторых аспектах вторая мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит 3'-НТО, имеющую сайт связывания микроРНК miR-122. В некоторых аспектах сайт связывания микроРНК miR-122 содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 175. В некоторых аспектах каждая из первой и второй мРНК содержит поли(А)-хвост. В некоторых аспектах поли(А)-хвост содержит около 100 нуклеотидов. В некоторых аспектах каждая из первой и второй мРНК содержит структуру 5′-кэп 1. В некоторых аспектах каждая из первой и второй мРНК содержит по меньшей мере одну химическую

модификацию. В некоторых аспектах химическая модификация представляет собой N1-метилпсевдоуридин. В некоторых аспектах первая мРНК является полностью модифицированной N1-метилпсевдоуридином. В некоторых аспектах вторая мРНК является полностью модифицированной N1-метилпсевдоуридином.

В некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает липидную наночастицу, содержащую:

(i) первую мРНК, содержащую нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 167; и

(ii) вторую мРНК, содержащую нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 168,

причем каждая из первой и второй мРНК является полностью модифицированной N1-метилпсевдоуридином, и

причем первая мРНК и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 5: 1.

В некоторых аспектах вышеуказанной липидной наночастицы, липидная наночастица имеет мольное соотношение около 20-60% ионизируемого аминолипида: 5-25% фосфолипида: 25-55% стерола; и содержит 0,5-15% ПЭГ-модифицированного липида. В некоторых аспектах ионизируемый аминолипид содержит соединение любой из формул (I), (IA), (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId) и (IIe). В некоторых аспектах ионизируемый аминолипид содержит соединение формулы (I). В некоторых аспектах соединение формулы (I) представляет собой соединение 25. В некоторых аспектах липидная наночастица имеет мольное соотношение около 50% соединения 25: около 10% DSPC: около 38,5% холестерина; и содержит около 1,5% ПЭГ-DMG.

В любом из предшествующих или связанных аспектов раскрытие обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую липидную наночастицу и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых аспектах фармацевтическую композицию составляют для внутримышечной доставки.

В любом из предшествующих или связанных аспектов раскрытие обеспечивает липидную наночастицу и необязательный фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтическую композицию для применения в лечении или задержке прогрессирования рака у индивидуума, причем лечение включает введение композиции в комбинации со второй композицией, при этом вторая композиция содержит полипептид-ингибитор контрольной точки и необязательный фармацевтически приемлемый носитель.

В любом из предшествующих или связанных аспектов раскрытие обеспечивает использование липидной наночастицы и необязательного фармацевтически приемлемого носителя при изготовлении лекарственного средства для лечения или задержки прогрессирования рака у индивидуума, причем лекарственное средство содержит липидную наночастицу и необязательный фармацевтически приемлемый носитель, и при этом лечение включает введение лекарственного средства в комбинации с композицией, содержащей полипептид-ингибитор контрольной точки и необязательный фармацевтически приемлемый носитель.

В любом из предшествующих или связанных аспектов раскрытие обеспечивает набор, содержащий контейнер, содержащий липидную наночастицу и необязательный фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтическую композицию, и листок-вкладыш, содержащий инструкции по введению липидной наночастицы или фармацевтической композиции для лечения или задержки прогрессирования рака у индивидуума. В некоторых аспектах листок-вкладыш дополнительно содержит инструкции по введению липидной наночастицы или фармацевтической композиции в комбинации с композицией, содержащей полипептид-ингибитор контрольных точек и необязательный фармацевтически приемлемый носитель для лечения или задержки прогрессирования рака у индивидуума.

В любом из предшествующих или связанных аспектов раскрытие обеспечивает набор, содержащий лекарственное средство, содержащее липидную наночастицу и необязательный фармацевтически приемлемый носитель, или фармацевтическую композицию и листок-вкладыш, содержащий инструкции по введению лекарственного средства отдельно или в комбинации с композицией, содержащей полипептид-ингибитор контрольных точек и необязательный фармацевтически приемлемый носитель для лечения или задержки прогрессирования рака у индивидуума. В некоторых аспектах набор дополнительно содержит листок-вкладыш, содержащий инструкции по введению первого лекарственного средства до, во время или после введения второго лекарственного средства для лечения или задержки прогрессирования рака у индивидуума.

В любом из предшествующих или связанных аспектов раскрытие обеспечивает липидную наночастицу, композицию или их применение, или набор, содержащий липидную наночастицу или композицию, как описано в данном документе, при этом полипептид-ингибитор контрольных точек ингибирует PD1, PD-L1, CTLA4 или их

комбинацию. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой антитело. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой антитело, выбранное из анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает CTLA4, анти-PD1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает PD1, анти-PD-L1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает PD-L1, и их комбинацию. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой анти-PD-L1 антитело, выбранное из атезолизумаба, авелумаба или дурвалумаба. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой анти-CTLA-4 антитело, выбранное из тремелимумаба или ипилимумаба. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой анти-PD1 антитело, выбранное из ниволумаба или пембролизумаба. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой анти-PD1 антитело, причем анти-PD1 антитело представляет собой пембролизумаб.

В связанных аспектах раскрытие обеспечивает способ снижения или уменьшения размера опухоли, или ингибирования роста опухоли у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту любой из вышеуказанных или связанных липидных наночастиц согласно раскрытию, или любой из вышеуказанных или связанных композиций согласно раскрытию.

В связанных аспектах раскрытие обеспечивает способ индукции противоопухолевого ответа у субъекта, страдающего раком, включающий введение субъекту любой из вышеуказанных или связанных липидных наночастиц согласно раскрытию, или любой из вышеуказанных или связанных композиций согласно раскрытию. В некоторых аспектах противоопухолевый ответ включает Т-клеточный ответ. В некоторых аспектах Т-клеточный ответ включает CD8+ Т-клетки.

В некоторых аспектах вышеуказанных способов композицию вводят при помощи внутримышечной инъекции.

В некоторых аспектах вышеупомянутых способов способ дополнительно включает введение второй композиции, содержащей полипептид-ингибитор контрольной точки и необязательный фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольных точек ингибирует PD1, PD-L1,

CTLA4 или их комбинацию. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой антитело. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой антитело, выбранное из анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает CTLA4, анти-PD1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает PD1, анти-PD-L1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает PD-L1, и их комбинацию. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой анти-PD-L1 антитело, выбранное из атезолизумаба, авелумаба или дурвалумаба. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой анти-CTLA-4 антитело, выбранное из тремелимумаба или ипилимумаба. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой анти-PD1 антитело, выбранное из ниволумаба или пембролизумаба. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой анти-PD1 антитело, причем анти-PD1 антитело представляет собой пембролизумаб.

В некоторых аспектах любого из вышеуказанных или связанных способов композицию, содержащую полипептид-ингибитор контрольной точки, вводят при помощи внутривенной инъекции. В некоторых аспектах композицию, содержащую полипептид-ингибитор контрольной точки, вводят один раз каждые 2-3 недели. В некоторых аспектах композицию, содержащую полипептид-ингибитор контрольной точки, вводят один раз каждые 2 недели или один раз каждые 3 недели. В некоторых аспектах композицию, содержащую полипептид-ингибитор контрольной точки, вводят до, одновременно или после введения липидной наночастицы или ее фармацевтической композиции.

В некоторых аспектах любого из вышеуказанных или связанных способов субъект имеет гистологически подтвержденную мутацию KRAS, выбранную из G12D, G12V, G13D или G12C.

В некоторых аспектах любого из вышеуказанных или связанных способов у субъекта имеется метастатический колоректальный рак.

В некоторых аспектах любого из вышеуказанных или связанных способов субъект имеетнемелкоклеточный рак легкого (НМРЛ).

В некоторых аспектах любого из вышеуказанных или связанных способов у субъекта имеется рак поджелудочной железы.

В других аспектах данное раскрытие обеспечивает способ снижения или уменьшения размера опухоли, ингибирования роста

опухоли или индукции противоопухолевого ответа у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту иммуномодулирующей терапевтической композиции, содержащей: одну или более первых мРНК, каждая из которых содержит открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, и необязательно одну или более вторых мРНК, каждая из которых содержит открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека, и необязательно при этом первая мРНК и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении, выбранном из группы, состоящей из 1: 1, 2: 1, 3: 1, 4: 1, 5: 1, 6: 1, 7: 1, 8: 1, 9: 1 или 10: 1; и фармацевтически приемлемый носитель, тем самым снижая или уменьшая размер опухоли, ингибируя рост опухоли или индуцируя противоопухолевый ответ у субъекта. В некоторых аспектах композиция содержит 1, 2, 3 или 4 мРНК, кодирующие 1, 2, 3 или 4 KRAS-пептида с активирующей онкогенной мутацией. В некоторых аспектах композиция содержит 4 мРНК, кодирующие 4 KRAS-пептида с активирующей онкогенной мутацией. В некоторых аспектах 4 KRAS-пептида с активирующей онкогенной мутацией содержат G12D, G12V, G12C и G13D.

В других аспектах способ включает введение иммуномодулирующей терапевтической композиции, содержащей первую, вторую, третью, четвертую и пятую мРНК, причем

первая мРНК содержит открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12D;

вторая мРНК содержит открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12V;

третья мРНК содержит открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12C;

четвертая мРНК содержит открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G13D; и

пятая мРНК содержит открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека,

при этом первая, вторая, третья, четвертая и пятая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING, выбранном из группы, состоящей из 1: 1, 2: 1, 3: 1, 4: 1, 5: 1, 6: 1, 7: 1, 8: 1, 9: 1 или 10: 1.

В некоторых аспектах KRAS-пептиды с активирующей онкогенной мутацией содержат аминокислотные последовательности, указанные в

SEQ ID NO: 39-41 и 72. В некоторых аспектах мРНК, кодирующая KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией содержит нуклеотидные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 126-128 и 132.

В других аспектах способ включает введение иммуномодулирующей терапевтической композиции, содержащей мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую конкатемер из двух или более KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией. В некоторых аспектах конкатемер содержит G12D, G12V, G12C и G13D. В некоторых аспектах конкатемер содержит от N к C-концу G12D, G12V, G13D и G12C. В некоторых аспектах конкатемер содержит от N к C-концу G12C, G13D, G12V и G12D. В некоторых аспектах конкатемер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, указанной в SEQ ID NO: 42-47, 73 и 137. В некоторых аспектах мРНК, кодирующая конкатемер, содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, указанной в SEQ ID NO: 129-131, 133 и 138.

В некоторых аспектах раскрытие обеспечивает способ снижения или уменьшения размера опухоли, ингибирования роста опухоли или индукции противоопухолевого ответа у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту липидной наночастицы, содержащей:

(i) одну или более первых мРНК, выбранных из группы, состоящей из:

мРНК, содержащей открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12D;

мРНК, содержащей открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12V;

мРНК, содержащей открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12C;

мРНК, содержащей открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G13D;

мРНК, содержащей открытую рамку считывания, кодирующую конкатемер из 2, 3 или 4 KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией, причем KRAS-пептиды с активирующей онкогенной мутацией содержат G12D, G12V, G12C и G13D; и

любой комбинации мРНК, указанных в (a)-(d); и

одну или более вторых мРНК, каждая из которых содержит открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека, необязательно,

при этом первая мРНК и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING, выбранном из группы, состоящей из 1: 1, 2: 1, 3: 1, 4: 1, 5: 1, 6: 1, 7: 1, 8: 1, 9: 1 или 10: 1,

тем самым снижая или уменьшая размер опухоли, ингибируя рост опухоли или индуцируя противоопухолевый ответ у субъекта.

В некоторых аспектах липидная наночастица содержит

(i) комбинацию мРНК, указанных в (a)-(d); и

(ii) вторую мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека, причем конститутивно активный полипептид STING человека содержит мутацию V155M,

при этом первая мРНК и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING, выбранном из группы, состоящей из 1: 1, 2: 1, 3: 1, 4: 1, 5: 1, 6: 1, 7: 1, 8: 1, 9: 1 или 10: 1.

В некоторых аспектах липидная наночастица содержит

(i) первую мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую конкатемер из 4 KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией, причем конкатемер содержит от N- к C-концу G12D, G12V, G13D и G12C; и

(ii) вторую мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека, причем конститутивно активный полипептид STING человека содержит мутацию V155M,

при этом первая мРНК и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING, выбранном из группы, состоящей из 1: 1, 2: 1, 3: 1, 4: 1, 5: 1, 6: 1, 7: 1, 8: 1, 9: 1 или 10: 1.

В некоторых аспектах раскрытие обеспечивает способ снижения или уменьшения размера опухоли, ингибирования роста опухоли или индукции противоопухолевого ответа у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту липидной наночастицы, содержащей:

(i) первую мРНК, содержащую нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 167; и

(ii) вторую мРНК, содержащую нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 168,

причем каждая из первой и второй мРНК является полностью модифицированной N1-метилпсевдоуридином, и при этом первая мРНК и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении 5: 1. В некоторых аспектах липидная наночастица имеет мольное соотношение около 50% соединения 25: около 10% DSPC: около 38,5%

холестерина; и содержит около 1,5% ПЭГ-DMG.

В некоторых аспектах липидную наночастицу или композицию вводят при помощи внутримышечной инъекции.

В некоторых аспектах противоопухолевый ответ включает ответ Т-клеток, такой как

ответ CD8+Т-клеток.

В некоторых аспектах раскрытие обеспечивает способ снижения или уменьшения размера опухоли, ингибирования роста опухоли или индукции противоопухолевого ответа у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту иммуномодулирующей терапевтической композиции или липидной наночастицы согласно раскрытию в комбинации со (до, одновременно или последовательно) второй композицией, содержащей полипептид-ингибитор контрольной точки или полинуклеотид, кодирующий его, и необязательный фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольных точек ингибирует PD1, PD-L1, CTLA4 или их комбинацию. В некоторых аспектах

полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой антитело. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой антитело, выбранное из анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает CTLA4, анти-PD1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает PD1, анти-PD-L1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает PD-L1, и их комбинацию. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой анти-PD-L1 антитело, выбранное из атезолизумаба, авелумаба или дурвалумаба. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой анти-CTLA-4 антитело, выбранное из тремелимумаба или ипилимумаба. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой анти-PD1 антитело, выбранное из ниволумаба или пембролизумаба.

В некоторых аспектах композицию, содержащую полипептид-ингибитор контрольной точки, вводят при помощи внутривенной инъекции. В некоторых аспектах композицию, содержащую полипептид-ингибитор контрольной точки, вводят один раз каждые 2-3 недели. В некоторых аспектах композицию, содержащую полипептид-ингибитор контрольной точки, вводят один раз каждые 2 недели или один раз каждые 3 недели. В некоторых аспектах

композицию, содержащую полипептид-ингибитор контрольной точки, вводят до, одновременно или после введения липидной наночастицы или композиции.

В некоторых аспектах раскрытие обеспечивает способ лечения субъектов, имеющих гистологически подтвержденную мутацию KRAS, выбранную из G12D, G12V, G13D или G12C. В некоторых аспектах субъект имеет гистологически подтвержденный подтип HLA, выбранный из HLA-A11 и/или HLA-C*08.

В некоторых аспектах опухоль представляет собой метастатический колоректальный рак. В некоторых аспектах опухоль представляет собой немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ). В некоторых аспектах опухоль представляет собой рак поджелудочной железы.

В некоторых аспектах субъекту вводят химиотерапевтический агент до, одновременно или после введения липидной наночастицы или композиции.

**Краткое описание графических материалов**

**На Фиг. 1** представлена гистограмма, демонстрирующая стимуляцию продукции ИФН-β в клетках TF1a, трансфицированных конститутивно активными конструктами ммРНК STING.

**На Фиг. 2** представлена гистограмма, демонстрирующая активацию интерферон-стимулируемого реагирующего элемента (ISRE) конститутивно активными конструктами STING. Варианты STING 23a и 23b соответствуют SEQ ID NO: 1, вариант STING 42 соответствует SEQ ID NO: 2, варианты STING 19, 21a и 21b соответствуют SEQ ID NO: 3, вариант STING 41 соответствует SEQ ID NO: 4, вариант STING 43 соответствует SEQ ID NO: 5, вариант STING 45 соответствует SEQ ID NO: 6, вариант STING 46 соответствует SEQ ID NO: 7, вариант STING 47 соответствует SEQ ID NO: 8, вариант STING 56 соответствует SEQ ID NO: 9 и вариант STING 57 соответствует SEQ ID NO: 10.

**На Фиг. 3A-3B** представлены гистограммы, демонстрирующие активацию интерферон-стимулируемого реагирующего элемента (ISRE) конститутивно активными конструктами IRF3 (**Фиг. 3A**) или конститутивно активными конструктами IRF7 (**Фиг. 3B**). Варианты IRF3 1, 3 и 4 соответствуют SEQ ID NO: 12, и варианты IRF3 2 и 5 соответствуют SEQ ID NO: 11 (варианты имеют разные метки). Вариант IRF7 36 соответствует SEQ ID NO: 18 и вариант 31 представляет собой мышиную версию SEQ ID NO: 18. Вариант IRF7 32 соответствует SEQ ID NO: 17 и вариант IRF7 33 соответствует SEQ

ID NO: 14.

**На Фиг. 4** представлена гистограмма, демонстрирующая активацию репортерного гена NFκB-люциферазы конститутивно активными конструктами мРНК cFLIP и IKKβ.

**На Фиг. 5** представлен график, демонстрирующий активацию репортерного гена NFκB-люциферазы конститутивно активными конструктами мРНК RIPK1.

**На Фиг. 6** представлена гистограмма, демонстрирующая индукцию ФНО-α в клетках SKOV3, трансфицированных конструктами ммРНК DIABLO.

**На Фиг. 7** представлена гистограмма, демонстрирующая индукцию интерлейкина-6 (ИЛ-6) в клетках SKOV3, трансфицированных конструктами ммРНК DIABLO.

**На Фиг. 8A-8B** представлены графики, демонстрирующие ответы, специфические к антигену MC38, при помощи внутриклеточного окрашивания (ICS) ИФН-γ на 21-е сутки (**Фиг. 8A**) или 35-е сутки (**Фиг. 8B**) $CD8^+$ спленоцитов от мышей, иммунизированных конструктом вакцины на основе неоантигена MC38 (ADRvax), объединенным в состав с конструктом иммуностимуляторной мРНК или STING, IRF3 или IRF7.

**На Фиг. 9A-9B** представлены графики, демонстрирующие процент $CD8b^+$ клеток среди живых $CD45^+$ клеток в селезенке или МКПК (**Фиг. 9A**) или процент $CD62L^{lo}$ клеток среди $CD8b^+$ клеток в селезенке или МКПК (**Фиг. 9B**) от мышей, иммунизированных конструктом вакцины на основе неоантигена MC38 (ADRvax), объединенным в состав с конструктом иммуностимуляторной мРНК или STING, IRF3 или IRF7.

**На Фиг.** 10 показана частота мутаций NRAS и KRAS при колоректальном раке, как определено с использованием cBioPortal.

**На Фиг. 11A-11B** представлены графики, демонстрирующие внутриклеточное окрашивание (ICS) $CD8^+$ спленоцитов у мышей, иммунизированных конструктами вакцины на основе E6/E7 HPV, объединенными в состав с конструктами иммуностимуляторных мРНК или STING, IRF3 или IRF7, на 21-е сутки после первой иммунизации. **На Фиг. 11A** показаны E7-специфические ответы для ICS в отношении ИФН-γ. **На Фиг. 11B** показаны E7-специфические ответы для ICS в отношении ФНО-α.

**На Фиг. 12A-12B** представлены графики, демонстрирующие внутриклеточное окрашивание (ICS) $CD8^+$ спленоцитов у мышей, иммунизированных конструктами вакцины на основе HPV E6/E7, объединенными в состав с иммуностимуляторным конструктом мРНК

или STING, IRF3 или IRF7. **На Фиг. 12A** показаны E6-специфические ответы для ICS в отношении ИФН-γ. **На Фиг. 12B** показаны E6-специфические ответы для ICS в отношении ФНО-α.

**На Фиг. 13A–13B** представлены графики, демонстрирующие E7-специфические ответы для внутриклеточного окрашивания (ICS) в отношении ИФН-γ на 21-е сутки (**Фиг. 13A**) или 53-е сутки (**Фиг. 13B**) $CD8^+$ спленоцитов от мышей, иммунизированных конструктами вакцины на основе E6/E7 HPV, объединенными в состав с конструктом иммуностимуляторной мРНК или STING, IRF3 или IRF7.

**На Фиг. 14A–14B** представлены графики, демонстрирующие процент $CD8b^+$ клеток среди живых $CD45^+$ клеток в течение 21 суток (**Фиг. 14A**) или 53 суток (**Фиг. 14B**) среди клеток селезенки от мышей, иммунизированных конструктами вакцины на основе E6/E7 HPV, объединенным в состав с конструктами иммуностимуляторных мРНК или STING, IRF3 или IRF7.

**На Фиг. 15A–15B** представлены графики, демонстрирующие окрашивание E7-MHC1-тетрамером на 21-е сутки (**Фиг. 15A**) или 53-е сутки (**Фиг. 15B**) $CD8b^+$ спленоцитов от мышей, иммунизированных конструктами вакцины на основе E6/E7 HPV, объединенными в состав с конструктами иммуностимуляторной мРНК или STING, IRF3 или IRF7.

**На Фиг. 16A–16D** представлены графики, демонстрирующие, что большинство E7-тетрамер$^+$ $CD8^+$ имеют фенотип эффекторных $CD62L^{lo}$ памяти, при этом сравнение E7-тетрамер$^+$ CD8 клеток на 21-е сутки и 53-е сутки демонстрирует, что этот фенотип эффекторных $CD62L^{lo}$ памяти сохранялся на протяжении всего исследования. **На Фиг. 16A** (21-е сутки) и **16B** (53-е сутки) продемонстрировано увеличение % CD8 с фенотипом эффекторных CD62Llo клеток. **На Фиг. 16C** и **16D** показано увеличение % E7-тетрамер+ CD8, являющихся CD62Llo.

**На Фиг. 17A–17C** представлены графики, демонстрирующие объем опухоли у мышей, вакцинированных с профилактической целью, как указано с использованием конструкта E6/E7 HPV вместе с конструктом иммуностимуляторной мРНК STING (отдельно или в комбинации с лечением анти-CTLA-4 или анти-PD1), или до, или во время заражения опухолью TC1, которая экспрессирует E7 HPV, демонстрируя ингибирование роста опухоли посредством лечения E6/E7 HPV+STING. Некоторых мышей лечили на -14-е и -7-е сутки растворимым E6/E7+STING (**Фиг. 17A**) или внутриклеточным E6/E7+STING (**Фиг. 17B**), с заражением опухолью на 1-е сутки. Других мышей лечили на 1-е и 8-е сутки растворимым E6/E7+STING

(**Фиг. 17C**), с заражением опухолью на 1-е сутки.

**На Фиг. 18A–18I** представлены графики, демонстрирующие объем опухоли у мышей, вакцинированных с терапевтической целью, как указано с использованием конструкта E6/E7 HPV вместе с конструктом иммуностимуляторной мРНК STING (**Фиг. 18A**), отдельно или в комбинации с лечением анти-CTLA-4 (**Фиг. 18B**) или анти-PD1 (**Фиг. 18C**), после заражения опухолью TC1, которая экспрессирует E7 HPV, демонстрируя ингибирование роста опухоли посредством лечения E6/E7 HPV+STING. **На Фиг. 18D–18I** показаны контрольные методы лечения.

**На Фиг. 19** представлен график, демонстрирующий внутриклеточное окрашивание (ICS) $CD8^+$ спленоцитов на ИФН-γ от мышей, иммунизированных конструктом вакцины ADR, объединенным в состав с иммуностимулятором STING в указанных соотношениях Аг: STING на 21-е сутки после первой иммунизации. CD8+ клетки повторно стимулировали или композицией мутантных антигенов ADR (содержащей три пептида), или композицией ADR дикого типа (в качестве контроля).

**На Фиг. 20** представлен график, демонстрирующий внутриклеточное окрашивание (ICS) на ФНО-α для $CD8^+$ спленоцитов от мышей, иммунизированных конструктом вакцины ADR, объединенным в состав с иммуностимулятором STING в указанных соотношениях Аг: STING на 21-е сутки после первой иммунизации. CD8+ клетки повторно стимулировали или композицией мутантных антигенов ADR (содержащей три пептида), или композицией ADR дикого типа (в качестве контроля).

**На Фиг. 21A–21C** представлены графики, демонстрирующие внутриклеточное окрашивание (ICS) на ИФН-γ для $CD8^+$ спленоцитов от мышей, иммунизированных конструктом вакцины ADR, объединенным в состав с иммуностимулятором STING в указанных соотношениях Аг: STING на 21-е сутки после первой иммунизации. CD8+ клетки повторно стимулировали мутантным пептидом или пептидом дикого типа (в качестве контроля), содержащимся в композиции антигенов ADR. **На Фиг. 21A** показаны ответы на пептид Adpk1 в композиции ADR. **На Фиг. 21B** показан ответ на пептид Reps1 в композиции ADR. **На Фиг. 21C** показан ответ на пептид Dpagt1 в композиции ADR.

**На Фиг. 22** представлен график, демонстрирующий антигенспецифические ответы Т-клеток на эпитопы ГКГС класса I в отношении вакцины CA-132, как измерено методом иммуноферментных пятен для ИФН-γ, у мышей, которых лечили комбинированным

препаратом CA-132 и иммуностимулятора STING, при указанных различных соотношениях Аг: STING.

**На Фиг. 23A-23B** показаны результаты исследований соотношений Аг: STING на мышах, иммунизированных конструктом вакцины E6/E7 HPV, объединенным в состав с конструктом иммуностимуляторной мРНК STING. **На Фиг. 23A** показано внутриклеточное окрашивание (ICS) на ИФН-γ для CD8+спленоцитов от мышей, иммунизированных в указанных соотношениях Аг: STING на 21-е сутки после иммунизации. **На Фиг. 23B** показано окрашивание H2-Kb/пептидом E7-тетрамером CD8+ спленоцитов на 21-е сутки у мышей, иммунизированных в указанных соотношениях Аг: STING.

**На Фиг. 24A-24C** представлены гистограммы, демонстрирующие результаты внутриклеточного окрашивания (ICS) на ФНО-α для CD8+ Т-клеток от яванских макак, вакцинированных вакциной против HPV+конструктами STING, с последующей стимуляцией ex vivo любым пулом пептидов E6 HPV16 (**Фиг. 24A**), пулом пептидом E7 HPV16 (**Фиг. 24B**) или средой (отрицательный контроль) (**Фиг. 24C**).

**На Фиг. 25A-25C** представлены гистограммы, демонстрирующие результаты внутриклеточного окрашивания (ICS) на ИЛ-2 для CD8+ Т-клеток от яванских макак, вакцинированных вакциной против HPV+конструктами STING, с последующей стимуляцией ex vivo любым пептидным пулом E6 HPV16 (**Фиг. 25A**), пептидным пулом E7 HPV16 (**Фиг. 25B**) или средой (отрицательный контроль) (**Фиг. 25C**).

**На Фиг. 26** представлен график, демонстрирующий результаты ИФА для анти-E6 IgG в сыворотке от яванских обезьян, вакцинированных/ иммунизированных вакциной против HPV+конструктами STING.

**На Фиг. 27** представлен график, демонстрирующий результаты ИФА для анти-E7 IgG в сыворотке от яванских обезьян, вакцинированных/ иммунизированных вакциной против HPV+конструктами STING.

**На Фиг. 28** представлен график, демонстрирующий результаты ИФА для анти-E6 IgG в серии двукратных разведений сыворотки на 25 сутки от яванских макак, получивших лечение вакциной против HPV+конструктом STING в соотношении STING: Аг 1:10.

**На Фиг. 29A-29B** представлены графики, демонстрирующие рассчитанные значения титра результатов ИФА для анти-E6 IgG (**Фиг.** 29A) или анти-E7 IgG (**Фиг. 29B**) на 25-е сутки в сыворотке от яванских макак, получавших вакцину против ВПЧ+конструкт STING в указанных соотношениях STING: Аг.

**На Фиг. 30** представлен график, демонстрирующий результаты внутриклеточного окрашивания (ICS) в отношении CD8+ спленоцитов на ИФН-γ от мышей, иммунизированных вакциной на основе мутантного KRAS+конструктом STING, с последующей стимуляцией *ex vivo* пептидом KRAS-G12V.

**На Фиг. 31** представлен график, демонстрирующий результаты внутриклеточного окрашивания (ICS) в отношении CD8+ спленоцитов на ИФН-γ от мышей, иммунизированных вакциной на основе мутантного KRAS+конструктом STING, с последующей стимуляцией *ex vivo* пептидом KRAS-G12D.

**На Фиг. 32** представлен график, демонстрирующий результаты внутриклеточного окрашивания (ICS) в отношении CD8+ спленоцитов на ИФН-γ от мышей, иммунизированных вакциной на основе мутантного KRAS+конструктом STING, с последующим совместным культивированием *ex vivo* с клетками Cos7, вирусно трансдуцированными аллелем HLA*A11, и активировали KRAS-G12V.

**На Фиг. 33** представлен график, демонстрирующий результаты внутриклеточного окрашивания (ICS) в отношении CD8+ спленоцитов на ИФН-гамма от мышей, иммунизированных вакциной на основе мутантного KRAS+конструктом STING, с последующим совместным культивированием *ex vivo* с клетками Cos7, вирусно трансдуцированными аллелем HLA*A11, и стимулировали KRAS-G12D.

**На Фиг. 34** представлен график, демонстрирующий результаты внутриклеточного окрашивания (ICS) в отношении CD8+ спленоцитов на ИФН-гамма от мышей, иммунизированных конкатемером вирусного эпитопа A11+конструктом STING с последующей стимуляцией *ex vivo* отдельными вирусными эпитопами.

**Подробное описание сущности изобретения**

В данном документе представлены иммуномодулирующие терапевтические композиции, включая композиции мРНК и/или липидные наночастицы, содержащие их, содержащие одну или более РНК (например, матричные РНК (мРНК)), которые могут безопасно направлять клеточные механизмы организма для продукции представляющего интерес ракового белка или его фрагмента, например, пептида с активирующей онкогенной мутацией. В некоторых вариантах осуществления РНК представляет собой модифицированную РНК. Иммуномодулирующие терапевтические композиции и липидные наночастицы согласно данному раскрытию могут быть использованы для индукции сбалансированного иммунного ответа против рака, включающего как клеточный, так и гуморальный

иммунитет, исключая, например, возможность инсерционного мутагенеза.

Соответственно, в некоторых аспектах раскрытие обеспечивает иммуномодулирующую терапевтическую композицию, включающую композицию на основе липидов, такую как липидные наночастицы, содержащую: одну или более мРНК, каждая из которых имеет открытую рамку считывания, кодирующую пептид с активирующей онкогенной мутацией, и необязательно одну или более мРНК, каждая из которых имеет открытую рамку считывания, кодирующую полипептид, который усиливает иммунный ответ на пептид с активирующей онкогенной мутацией у субъекта, причем иммунный ответ включает клеточный или гуморальный иммунитет.

В одном аспекте раскрытие обеспечивает иммуномодулирующую терапевтическую композицию, содержащую четыре различных пептида с активирующей онкогенной мутацией (например, KRAS G12D, G12C, G12V и G13D), которая пригодна для лечения пациентов, страдающих одним из колоректального рака, карциномы поджелудочной железы и мелкоклеточного рака легкого. Способность нацеливаться на четыре разных мутации и три разных злокачественных новообразования является значительным преимуществом композиций и способов, представленных в данном документе.

мРНК, кодирующая полипептид, который усиливает иммунный ответ на пептид с активирующей онкогенной мутацией у субъекта, также называется в данном документе «иммуностимуляторной мРНК» или «мРНК, кодирующую иммуностимулятор» или просто «иммуностимулятор». Усиленный иммунный ответ может быть клеточным ответом, гуморальным ответом или обоими. Используемый в данном документе термин «клеточный» иммунный ответ предназначен для охвата иммунных ответов, которые вовлекают или опосредованы Т-клетками, тогда как «гуморальный» иммунный ответ предназначен для охвата иммунных ответов, которые вовлекают или опосредуются В-клетками. мРНК, кодирующая иммуностимулятор, может усиливать иммунный ответ, например, путем

(i) стимуляцией сигнального пути интерферона типа I;

(ii) стимуляцией сигнального пути NFkB;

(iii) стимуляцией воспалительного ответа;

(iv) стимуляцией продукции цитокинов; или

(v) стимуляцией развития, активности или мобилизации дендритных клеток; и

(vi) комбинацией любого из (i)-(v).

Используемый в данном документе термин «стимуляция сигнального пути интерферона типа I» предназначен для включения активации одного или более компонентов сигнального пути интерферона типа I (например, модификации фосфорилирования, димеризации или тому подобного таких компонентов для активации тем самым пути), стимуляции транскрипции интерферон-стимулируемым реагирующим элементом (ISRE) и/или стимуляции продукции или секреции интерферона типа I (например, ИФН-α, ИФН-β, ИФН-ε, ИФН-к и/или ИФН-ω). Используемый в данном документе термин «стимуляция сигнального пути NFkB» предназначен для включения активации одного или более компонентов сигнального пути NFkB (например, модификации фосфорилирования, димеризации или тому подобное таких компонентов для активации тем самым пути), стимуляции транскрипции в сайте NFkB и/или стимуляции продукции генного продукта, экспрессия которого регулируется NFkB. Используемый в данном документе термин «стимуляция воспалительного ответа» предназначен для охвата стимуляции продукции воспалительных цитокинов (включая, но не ограничиваясь этим, интерфероны типа I, ИЛ-6 и/или ФНО-α). Используемый в данном документе термин «стимуляция развития, активности или мобилизации дендритных клеток» подразумевает прямую или косвенную стимуляцию созревания, пролиферации и/или функциональной активности дендритных клеток.

Данное раскрытие обеспечивает композиции, включая композиции мРНК и/или содержащие их липидные наночастицы, которые содержат один или более конструктов мРНК, кодирующих полипептид, который усиливает иммунные ответы на пептид с активирующей онкогенной мутацией (также называемый в данном документе как «представляющий интерес антиген»), упоминаемые в данном документе как иммуностимуляторная мРНК или иммуностимуляторные мРНК, включая химически модифицированные мРНК (ммРНК). Иммуностимуляторные мРНК согласно раскрытию усиливают иммунные ответы, например, путем активации сигнального пути интерферона I типа, так что стимулируются антигенспецифические ответы на представляющий интерес антиген (то есть активируют пептид(ы) с активирующей онкогенной мутацией).

Иммуностимуляторные мРНК согласно раскрытию усиливают иммунные ответы на экзогенный антиген, который вводят субъекту с иммуностимуляторной мРНК (например, конструкт мРНК, кодирующий

пептид(ы) с активирующей онкогенной мутацией, который объединяют в состав и совместно вводят с иммуностимуляторной мРНК, или конструкт мРНК, кодирующий пептид(ы) с активирующей онкогенной мутацией, который составляют и вводят отдельно от иммуностимуляторной мРНК). Введение иммуностимуляторной мРНК усиливает иммунный ответ у субъекта путем стимуляции, например, продукции цитокинов, ответов Т-клеток (например, антигенспецифических ответов $CD8^+$ или $CD4^+$ Т-клеток ) или ответов В-клеток (например, продукции антигенспецифических антител) у субъекта.

В других аспектах раскрытие обеспечивает композиции, включая композиции мРНК и липидные наночастицы, содержащие один или более конструктов мРНК (например, один или более конструктов ммРНК), причем один или более конструктов мРНК кодируют пептид(ы) с активирующей онкогенной мутацией, и в том же или отдельном конструкте мРНК кодируют полипептид, который усиливает иммунный ответ на представляющий интерес антиген. В некоторых аспектах раскрытие обеспечивает наночастицы, например, липидные наночастицы, которые содержат иммуностимуляторную мРНК, которая усиливает иммунный ответ, отдельно или в комбинации с мРНК, которые кодируют пептид(ы) с активирующей онкогенной мутацией. Раскрытие также обеспечивает фармацевтические композиции, содержащие любую из мРНК, как описано в данном документе, или наночастицы, например, липидные наночастицы, содержащие любую из мРНК, как описано в данном документе.

В других аспектах раскрытие обеспечивает способ усиления иммунного ответа на пептид(ы) с активирующей онкогенной мутацией путем введения субъекту одной или более мРНК, кодирующих пептид(ы) с активирующей онкогенной мутацией, и мРНК, кодирующей полипептид, который усиливает иммунный ответ к представляющему интерес пептиду(ам), или их липидной наночастицы или их фармацевтической композиции, так что у субъекта усиливается иммунный ответ на пептид(ы) с активирующей онкогенной мутацией. Способы усиления иммунного ответа можно использовать, например, для стимуляции иммуногенного ответа на опухоль у субъекта.

**Представляющие интерес антигены рака**

Иммуностимуляторные мРНК согласно раскрытию полезны в комбинации с любым типом антигена, для которого желательно усиление иммунного ответа, в том числе с последовательностями мРНК, кодирующими по меньшей мере один представляющий интерес

антиген (или в том же, или в отдельном конструкте мРНК), для усиления иммунных ответов против представляющего интерес антигена, такого как опухолевый антиген. Таким образом, иммуностимуляторные мРНК согласно раскрытию усиливают, например, ответы мРНК-вакцины, тем самым действуя в качестве генетических адъювантов.

Пептиды с активирующей онкогенной мутацией

В одном варианте осуществления представляющий интерес антиген(ы) представляет собой опухолевый антиген. В одном варианте осуществления опухолевый антиген содержит опухолевый неоэпитоп, например, мутантный пептид из опухолевого антигена. В одном варианте осуществления опухолевый антиген представляет собой антиген Ras. В данной области техники описан полный анализ мутаций Ras при раке (Prior, I.A. et al. (2012) *Cancer Res.* 72:2457-2467). Соответственно, аминокислотная последовательность Ras, содержащая по меньшей мере одну мутацию, связанную с раком, может быть использована в качестве представляющего интерес антигена. В одном варианте осуществления опухолевый антиген представляет собой мутантный антиген KRAS. Мутантные антигены KRAS участвуют в приобретенной устойчивости к определенным терапевтическим агентам (см., например, Misale, S. et al. (2012) *Nature* 486:532-536; Diaz, L.A. et al. (2012) *Nature* 486:537-540).

Хотя были предприняты попытки получения функциональных иммуномодулирующих терапевтических композиций, включая композиции мРНК, терапевтическая эффективность данных композиций РНК еще не полностью установлена. Совершенно неожиданно авторы изобретения обнаружили класс составов для доставки иммуномодулирующих терапевтических композиций мРНК, которые приводят к значительно усиленным и во многих отношениях синергетическим иммунным ответам, включая усиленный ответ Т-клеток. KRAS является наиболее часто мутируемым онкогеном при раке человека (~ 15%). Такие мутации KRAS в основном сохраняются в нескольких «горячих точках мутагенеза» и активируют онкоген.

Иммуномодулирующие терапевтические композиции согласно изобретению содержат пептиды с активирующей онкогенной мутацией, такие как мутантные пептиды KRAS. Предыдущие исследования показали ограниченную способность количественно увеличивать Т-клетки, специфические в отношении онкогенной мутации. Большая часть данного исследования была сделана в контексте наиболее

распространенного аллеля HLA (A2, который встречается у ~ 50% представителей европеоидной расы). В более поздней работе было исследовано образование специфических Т-клеток против точечных мутаций в контексте менее распространенных аллелей HLA (A11, C8). Эти результаты имеют существенное значение для лечения рака. Онкогенные мутации распространены во многих злокачественных новообразованиях. Способность нацеливаться на эти мутации и генерировать Т-клетки, что является достаточным для уничтожения опухолей, имеет широкое применение в терапии рака. Совершенно неожиданно, что доставка антигенов с использованием мРНК имеет такое значительное преимущество по сравнению с доставкой пептидных вакцин. Таким образом, изобретение включает, в некоторых аспектах, неожиданное открытие, что антигены с активирующей онкогенной мутацией, доставляемые in vivo в форме мРНК, значительно усиливает генерацию ответов эффекторных Т-клеток и Т-клеток памяти.

Молекулы HLA класса I являются высокополиморфными трансмембранными гликопротеинами, состоящими из двух полипептидных цепей (тяжелой цепи и легкой цепи). Человеческий лейкоцитарный антиген, главный комплекс гистосовместимости у людей, является специфическим для каждого человека и имеет наследственные признаки. Тяжелые цепи класса I кодируются тремя генами: HLA-A, HLA-B и HLA-C. Молекулы HLA класса I важны для установления иммунного ответа путем презентации эндогенных антигенов Т-лимфоцитам, которые инициируют цепь иммунных реакций, которые приводят к элиминации опухолевых клеток цитотоксическими Т-клетками. Измененные уровни продукции антигенов HLA класса I являются широко распространенным явлением при злокачественных новообразованиях и сопровождается значительным ингибированием функции противоопухолевых Т-клеток. Он представляет собой один из основных механизмов, используемых раковыми клетками для обхода иммунологического надзора. Пониженные уровни антигенов HLA класса I были обнаружены в 90% опухолей при НМРЛ (n=65). Уменьшение или потеря HLA были обнаружены в 76% образцов опухолей поджелудочной железы (n=19). Экспрессия антигенов HLA класса I при раке толстой кишки была резко снижена или не обнаружена в 96% образцов опухоли (n=25).

Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что опухолевые клетки используют две общие стратегии для избегания иммунологического надзора: иммуноселекция (недостаточно

иммуногенные варианты опухолевых клеток) и иммуносубверсия (изменение в иммунной системы). Была продемонстрирована корреляция между изменениями в антигенах HLA класса I и наличием мутаций кодона 12 KRAS, что свидетельствует о возможном индуктивном эффекте мутаций кодона 12 KRAS на регуляцию антигена HLA класса I при прогрессировании рака. По прогнозам, многие частые мутации рака связывают аллели HLA класса I с высокой аффинностью (ИК50 <= 50 нМ)7 и могут быть пригодны для профилактической противораковой вакцинации.

Создание раковых антигенов, которые вызывают желаемый иммунный ответ (например, Т-клеточные ответы) против целевых полипептидных последовательностей в процессе иммуномодулирующего терапевтического развития, остается сложной задачей. Изобретение включает технологию преодоления препятствий, связанных с таким развитием. Посредством использования технологии согласно изобретению можно вызывать желаемый иммунный ответ путем выбора подходящих пептидов с активирующей онкогенной мутацией и составления мРНК, кодирующих пептидов, для эффективной доставки *in vivo*.

Иммуномодулирующие терапевтические композиции обеспечивают уникальные терапевтические альтернативы пептидным или ДНК-вакцинам. Когда мРНК-содержащую иммуномодулирующую терапевтическую композицию доставляют в клетку, мРНК будет транслироваться в полипептид с помощью внутриклеточного механизма, который затем может процессировать полипептид в чувствительные фрагменты, которые могут быть представлены на MDC (миелоидных дендритных клетках) и стимулировать иммунный ответ против опухоли.

Иммуномодулирующие терапевтические композиции, описанные в данном документе, содержат по меньшей мере один полинуклеотид рибонуклеиновой кислоты (РНК), имеющий открытую рамку считывания, кодирующую по меньшей мере один антигенный полипептид рака или его иммуногенный фрагмент (например, иммуногенный фрагмент, способный индуцировать иммунный ответ на злокачественную опухоль). Антигенный пептид включает активирующую онкогенную мутацию. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления композиция представляет собой множество эпитопов смеси активирующих онкогенных мутаций. Многие активирующие онкогенные мутации известны в данной области техники.

Когда онкогены активируются, они могут ингибировать запрограммированную гибель клеток и/или вызывать аномальную клеточную пролиферацию. Такая активация онкогена может привести к раку. Ген KRAS (гомолог вирусного онкогена саркомы крыс Кирстен Ki-ras2) представляет собой онкоген, который кодирует белок-трансдуктор малой ГТФазы. KRAS передает внешние сигналы в ядро клетки и способствует регуляции клеточного деления. Активирующие мутации в гене KRAS нарушают способность белка KRAS переключаться между активным и неактивным состояниями. Активация KRAS приводит к трансформации клеток и повышению устойчивости к химиотерапии и биологической терапии, направленной на рецепторы эпидермального фактора роста. (Jancik, Sylwia et al. Clinical Relevance of KRAS in Human Cancers, Journal of Biomedicine and Biotechnology, Volume 2010 Article ID 150960 (2010)). Аминокислотная последовательность KRAS человека представлена ниже (UniProtKB P01116). Мутации KRAS характерны для многих видов рака, и G12 является сайтом наиболее распространенных мутаций KRAS.

>sp|P01116|1-186

MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDTA GQEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHHYREQIKRVKDSEDVPMVLVGNKCDLPSR TVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQRVEDAFYTLVREIRQYRLKKISKEEKTPGCVKIKKC (SEQ ID NO: 166)

Мутантные белки N-RAS широко распространены при определенных видах рака и полезны в качестве противораковых вакцин. Например, 29% меланомы кожи включает мутацию RAS, из которых 94% имеют происхождение N-RAS. Это составляет около 2500 новых случаев в США в год наиболее агрессивной формы меланомы, на которую приходится большинство случаев смерти от меланомы. (Channing Der, Are All RAS Proteins Created Equal in Cancer?, September 22, 2014, cancer.gov). Ежегодно регистрируется 30280 случаев множественной миеломы, из которых 26% составляют NRAS*. Это составляет ~ 6100 новых случаев NRAS* в год. Таким образом, описанные в данном документе вакцины на основе N-Ras полезны в некоторых вариантах осуществления для лечения меланомы и множественной миеломы, а также других злокачественных новообразований, которые содержат мутации NRAS.

Соответственно, в некоторых аспектах данное раскрытие обеспечивает пептидные последовательности, кодирующие мРНК, возникающие в результате определенных активирующих мутаций в

одном или более онкогенах, не ограничиваясь бессмысленными SNV (однонуклеотидными вариациями), и часто приводящих к альтернативному сплайсингу, для использования в качестве мишеней для терапевтической вакцинации. В некоторых вариантах осуществления активирующая онкогенная мутация представляет собой мутацию KRAS. В некоторых вариантах осуществления мутация KRAS представляет собой мутацию G12. В некоторых вариантах осуществления мутацию KRAS G12 выбирают из мутации KRAS G12D, G12V, G12S, G12C, G12A и G12R, например, мутацию KRAS G12 выбирают из мутации KRAS G12D, G12V и G12S. В некоторых вариантах осуществления мутацию KRAS G12 выбирают из мутации KRAS G12D, G12V и G12C. В других вариантах осуществления мутация KRAS представляет собой мутацию G13, например, мутация KRAS G13 представляет собой мутацию KRAS G13D. В некоторых вариантах осуществления активирующая онкогенная мутация представляет собой мутацию H-RAS или N-RAS.

В одном варианте осуществления одна или более мРНК кодируют мутантный пептид(ы) KRAS, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую одну или более мутаций, выбранных из G12D, G12V, G13D и G12C и их комбинаций. Неограничивающие примеры мутантных антигенов KRAS включают те, которые содержат одну или более аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 36-41 и 72, 125.

CD8+ Т-клетки, специфические для мутаций G12D или G12V, могут быть ограничены HLA-A*02:01, A*03:01; -A*11:01, -B*35:01, -Cw*08:02 и, возможно, другими. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления мутацию KRAS выбирают для включения в иммуномодулирующую терапевтическую композицию для субъекта, имеющего Т-клетки, которые ограничены HLA-A*02:01, A*03:01; -A*11:01, -B*35:01, или -Cw*08:02. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет Т-клетки, которые ограничены HLA-A*02:01.

В одном варианте осуществления мутантный антиген KRAS представляет собой один или более мутантных 15-мерных пептидов KRAS, содержащих мутацию, выбранную из G12D, G12V, G13D и G12C, неограничивающие примеры которых приведены в SEQ ID NO: 36-38 и 125.

В другом варианте осуществления мутантный антиген KRAS представляет собой один или более мутантных 25-мерных пептидов KRAS, содержащих мутацию, выбранную из G12D, G12V, G13D и G12C,

неограничивающие примеры которых приведены в SEQ ID NO: 39-41 и 72.

В другом варианте осуществления мутантный антиген KRAS представляет собой один или более мутантных 3×15-мерных пептидов KRAS (3 копии 15-мерного пептида), содержащих мутацию, выбранную из G12D, G12V, G13D и G12C, неограничивающие примеры которых приведены в SEQ ID NO: 42-44 и 183.

В другом варианте осуществления мутантный антиген KRAS представляет собой один или более мутантных 3×25-мерных пептидов KRAS (три копии 25-мерного пептида), содержащих мутацию, выбранную из G12D, G12V, G13D и G12C, неограничивающие примеры которых приведены в SEQ ID NO: 45-47 и 73.

В другом варианте осуществления мутантный антиген KRAS представляет собой 100-мерный конкатемерный пептид из 25-мерных пептидов, содержащих мутации G12D, G12V, G13D и G12C (то есть 100-мерный конкатемер SEQ ID NO: 39, 40, 41 и 72). Соответственно, в одном варианте осуществления мутантный антиген KRAS содержит конструкт мРНК, кодирующий SEQ ID NO: 39, 40, 41 и 72. Неограничивающие примеры нуклеотидных последовательностей, кодирующих конкатемер пептидов, содержащих мутации G12D, G12V, G13D и G12C, включают SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 167 и SEQ ID NO: 169. Дополнительное описание мутантных антигенов KRAS, их аминокислотных последовательностей и кодирующих их последовательностей мРНК раскрыто в заявке США, серийный номер 62/453,465, полное содержание которой специально включено в данный документ посредством ссылки.

Некоторые варианты осуществления данного раскрытия обеспечивают иммуномодулирующие терапевтические композиции, которые содержат мРНК, имеющую открытую рамку считывания, кодирующую конкатемер из двух или более пептидов с активирующей онкогенной мутацией. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два пептидных эпитопа отделены друг от друга одним глицином. В некоторых вариантах осуществления конкатемер содержит 3-10 пептидов с активирующей онкогенной мутацией. В некоторых таких вариантах осуществления все пептидные эпитопы отделены друг от друга одним глицином. В других вариантах по меньшей мере два пептидных эпитопа связаны непосредственно друг с другом без линкера.

В одном варианте осуществления опухолевый антиген кодируется конструктом мРНК, которая также содержит

иммуностимулятор (то есть также кодирует полипептид, который усиливает иммунный ответ против опухолевого антигена). Неограничивающие примеры таких конструктов включают конструкты KRAS-STING, кодирующие одну из аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 48-71. Неограничивающие примеры нуклеотидных последовательностей, кодирующих конструкты KRAS-STING, приведены в SEQ ID NO: 160-163 и 221-224.

Данное раскрытие обеспечивает иммуномодулирующую терапевтическую композицию, содержащую: мРНК, имеющую открытую рамку считывания, кодирующую конкатемер из двух или более пептидов с активирующей онкогенной мутацией, причем конкатемер содержит KRAS-пептиды с активирующей онкогенной мутацией G12D, G12V, G12C и G13D; и одну или более мРНК, каждая из которых содержит открытую рамку считывания, кодирующую полипептид, который усиливает иммунный ответ на KRAS-пептиды с активирующей онкогенной мутацией у субъекта. Такая иммуномодулирующая композиция нацелена на соматические точечные мутации KRAS, которые представляют собой не только исключительно опухолеспецифические неоантигены, но также значительные онкогенные драйверные мутации при различных злокачественных новообразованиях. В отличие от многих неоантигенов, которые в значительной степени являются мутациями-пассажирами, поддержание экспрессии мутантного KRAS важно для выживания раковых клеток, поскольку она помогает управлять аберрантной пролиферацией клеток и, вероятно, является основным событием (ранним событием и, следовательно, присутствует во многих опухолевых клетках).

Чтобы смоделировать мутантные антигены KRAS в доклинических исследованиях, описанных в данном документе, при изучении иммуностимулирующей способности STING, были выбраны два модельных антигена: (1) E6 и E7 HPV и (2) конкатемер ADR трех точечных мутаций из трех генов, обнаруженных в линии мышиных клеток MC38. Эти антигены являются подходящими моделями мутантных антигенов KRAS по ряду причин. Например, E6 и E7 HPV представляют собой вирусные онкогенные белки, экспрессия которых является жизненно важной для трансформированного фенотипа, подобного мутанту KRAS. Соответственно, E6 и E7 HPV являются подходящими модельными антигенами, потому что, подобно мутантному KRAS, они являются онкогенными драйверами. Три мутантных эпитопа ADR, напротив, являются стандартными

неоантигенами в том смысле, что они, скорее всего, являются мутациями- пассажирами. Однако ADR более эффективно моделирует другие свойства антигенов KRAS, кодируемых нашей вакциной, в том, что: (1) каждый антиген содержит одну миссенс-мутацию относительно своего аналога дикого типа, которая, вероятно, будет более сложной для распознавания иммунной системой как «чужая», чем вирусный антиген, и (2) они конкатемеризируются.

Иммуномодулирующие терапевтические композиции согласно раскрытию могут содержать один или более раковых антигенов. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующая терапевтическая композиция состоит из 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более 6 или более 7 или более, 8 или более, 9 или более антигенов, например, пептидов с активирующей онкогенной мутацией. В других вариантах осуществления иммуномодулирующая терапевтическая композиция состоит из 1000 или менее, 900 или менее, 500 или менее, 100 или менее, 75 или менее, 50 или менее, 40 или менее, 30 или менее, 20 или менее, или 100 или менее антигенов, например, пептидов с активирующей онкогенной мутацией В еще одних других вариантах осуществления иммуномодулирующая терапевтическая композиция имеет 3-10, 3-100, 5-100, 10-100, 15-100, 20-100, 25-100, 30-100, 35-100, 40-100, 45-100, 50-100, 55-100, 60-100, 65-100, 70-100, 75-100, 80-100, 90-100, 5-50, 10-50, 15-50, 20-50, 25-50, 30-50, 35-50, 40-50, 45-50, 100-150, 100-200, 100-300, 100-400, 100-500, 50-500, 50-800, 50-1000 или 100-1000 раковых антигенов, например, пептидов с активирующей онкогенной мутацией.

Используемый в данном документе эпитоп, также известный как антигенная детерминанта, представляет собой часть антигена, который распознается иммунной системой в соответствующих условиях, в частности антителами, В-клетками или Т-клетками. Эпитопы включают В-клеточные эпитопы и Т-клеточные эпитопы. В-клеточные эпитопы представляют собой пептидные последовательности, которые необходимы для распознавания специфическими антителообразующими В-клетками. В-клеточные эпитопы относятся к определенной области антигена, которая распознается антителом. Часть антитела, которая связывается с эпитопом, называется паратопом. Эпитоп может представлять собой конформационный эпитоп или линейный эпитоп, основанный на структуре и взаимодействии с паратопом. Линейный или непрерывный эпитоп определяется первичной аминокислотной последовательностью

определенной области белка. Последовательности, которые взаимодействуют с антителом, расположены рядом друг с другом последовательно на белке, и эпитоп обычно может быть имитирован одним пептидом. Конформационные эпитопы представляют собой эпитопы, которые определяются конформационной структурой нативного белка. Эти эпитопы могут быть непрерывными или прерывистыми, то есть компоненты эпитопа могут располагаться на различных частях белка, которые в структуре свернутого нативного белка располагаются близко друг к другу.

Т-клеточные эпитопы представляют собой пептидные последовательности, которые в ассоциации с белками на АПК, необходимы для распознавания специфическими Т-клетками. Т-клеточные эпитопы подвергаются процессингу внутри клеток и презентации на поверхности АПК, где они связаны с молекулами ГКГС, включая ГКГС класса II и ГКГС класса I. Пептидный эпитоп может иметь любую длину, которая является приемлемой для эпитопа. В некоторых вариантах осуществления пептидный эпитоп состоит из 9-30 аминокислот. В других вариантах осуществления длина составляет 9- 22, 9-29, 9-28, 9-27, 9-26, 9-25, 9-24, 9-23, 9-21, 9-20, 9-19, 9-18, 10-22, 10-21, 10-20, 11-22, 22-21, 11-20, 12-22, 12-21, 12-20,13-22, 13-21, 13-20, 14-19, 15-18, или 16-17 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующая терапевтическая композиция может содержать сенсибилизирующий антиген, также иногда называемый антигеном памяти. Сенсибилизирующий антиген представляет собой антиген, с которым ранее сталкивался человек, и для которого есть предсуществующие лимфоциты памяти. В некоторых вариантах осуществления сенсибилизирующий антиген может представлять собой антиген инфекционного заболевания, с которым индивидуум, вероятно, сталкивался, такой как антиген гриппа. Сенсибилизирующий антиген помогает стимулировать более сильный иммунный ответ.

Терапевтическая мРНК может быть доставлена отдельно или в комбинации с другими противораковыми агентами такими как ингибиторы контрольных точек, для обеспечения значительно усиленного иммунного ответа против опухолей. Ингибиторы контрольных точек могут усиливать действие мРНК, кодирующей активирующие онкогенные пептиды, устраняя некоторые препятствия на пути стимуляции иммунного ответа, таким образом позволяя активированным Т-клеткам эффективно стимулировать иммунный ответ

против опухоли.

мРНК может быть доставлена субъекту в форме носителя, такого как липидная наночастица (LNP). Ряд LNP известен в данной области техники. Например, было обнаружено, что некоторые LNP, такие как те, которые использовались ранее для доставки различных киРНК на животных моделях, а также на людях, вызывают нежелательный воспалительный ответ, связанный с временным ответом IgM, который обычно приводит к снижению продукции антигена и ослабленному иммунному ответу. В отличие от результатов, обнаруженных для киРНК, в данном документе представлены иммуномодулирующие терапевтические композиции мРНК в виде липидных наночастиц, которые генерируют Т-клеточные ответы, достаточные для терапевтических способов, а не стимулируют временные ответы IgM. Описанные в данном документе LNP не являются липосомами. Используемая в данном документе липосома представляет собой структуру на основе липидов, имеющую простую липидную бислойную оболочку с полезной нагрузкой в виде нуклеиновой кислоты в ядре.

Конструкт мРНК, кодирующий представляющий интерес антиген(ы), обычно содержит, в дополнение к последовательностям, кодирующим антиген, другие структурные характеристики, как описано в данном документе для конструктов мРНК (например, модифицированные нуклеотидные основания, 5'-кэп, 5'-НТО, 3'-НТО, miR-связывающий сайт(ы), поли(А)-хвост, как описано в данном документе). Подходящие компоненты конструкта мРНК являются такими, как описано в данном документе.

Персонализированные раковые антигены-неоэпитопы

Раковые антигены могут представлять собой персонализированные раковые антигены. Например, персонализированные иммуномодулирующие терапевтические композиции могут содержать РНК, кодирующую один или более известных раковых антигенов, специфических для опухолевых или раковых антигенов, специфических для каждого субъекта, называемых неоэпитопами или субъект-специфическими эпитопами или антигенами. «Субъект-специфический раковый антиген» представляет собой антиген, который был идентифицирован как экспрессируемый в опухоли конкретного пациента. Субъект-специфический раковый антиген обычно может присутствовать или не присутствовать в образцах опухоли. Опухолеассоциированные антигены, которые не экспрессируются или редко экспрессируются в нераковых клетках

или экспрессия которых в нераковых клетках достаточно снижена по сравнению с экспрессией в раковых клетках и которые вызывают иммунный ответ, индуцированный при вакцинации, называются неоэпитопами. Неоэпитопы, такие как опухолеассоциированные антигены абсолютно чужеродны для организма и, следовательно, не вызывают иммунного ответа против здоровых тканей и не маскируются защитными компонентами иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления персонализированные иммуномодулирующие терапевтические композиции на основе неоэпитопов являются желательными, поскольку такие вакцинные композиции будут максимизировать специфичность в отношении конкретной опухоли пациента. Неоэпитопы, происходящие из мутаций, могут возникать в результате точечных мутаций, несинонимичных мутаций, приводящих к различным аминокислотам в белке; мутаций с прочитанным терминатором, в которых стоп-кодон модифицирован или удален, что приводит к трансляции более длинного белка с новой опухолеспецифической последовательностью на С-конце; мутаций сайта сплайсинга, которые приводят к включению интрона в зрелую мРНК и, таким образом, к уникальной опухолеспецифической последовательности белка; хромосомных перестроек, которые приводят к образованию химерного белка с опухолеспецифическими последовательностями на стыке 2 белков (например, слияние генов); мутаций или делеций со сдвигом рамки считывания, которые приводят к новой открытой рамке считывания с новой опухолеспецифической белковой последовательностью; и транслокаций. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующие терапевтические композиции содержат по меньшей мере 1 раковый антиген, включая мутации, выбранные из группы, состоящей из мутаций со сдвигом рамки считывания и рекомбинаций или любых других мутаций, описанных в данном документе.

Способы получения персонализированных иммуномодулирующих терапевтических композиций обычно включают идентификацию мутаций, например, с использованием методов глубокого секвенирования нуклеиновых кислот или белков, идентификацию неоэпитопов, например, с использованием утвержденных алгоритмов прогнозирования связывания пептид-ГКГС или других аналитических методов для создания набора кандидатных Т-клеточных эпитопов, которые могут связываться с аллелями HLA пациента и основаны на мутациях, присутствующих в опухолях, необязательной демонстрации

антигенспецифических Т-клеток против выбранных неоэпитопов или демонстрации того, что кандидатный неоэпитоп связан с белками HLA на поверхности опухоли; и разработку вакцины. Иммуномодулирующие терапевтические композиции согласно изобретению могут содержать множество копий одного неоэпитопа, множество разных неоэпитопов, основанных на одном типе мутации, то есть точечной мутации, множество разных неоэпитопов, основанных на множестве типов мутаций, неоэпитопы и другие антигены, такие как опухолеассоциированные антигены или сенсибилизирующие антигены.

Примеры методов идентификации мутаций включают, но не ограничиваются ими, динамическую аллель-специфическую гибридизацию (DASH), микропланшетный диагональный электрофорез в геле (MADGE), пиросеквенирование, олигонуклеотид-специфическое лигирование, систему TaqMan, а также различные технологии ДНК-чипов, т.е. чипы Affymetrix SNP и методы, основанные на генерации малых сигнальных молекул путем инвазивного расщепления с последующей масс-спектрометрией или иммобилизацией замыкающими кольцо зондами и амплификацией по типу катящегося кольца.

Методы глубокого секвенирования нуклеиновых кислот или белков известны в данной области техники. Можно использовать любой метод секвенирования. Секвенирование нуклеиновой кислоты может быть выполнено для целых опухолевых геномов, опухолевых экзомов (ДНК, кодирующая белок), опухолевых транскриптомов или экзосом. Технологии одномолекулярного секвенирования в реальном времени путем синтеза основана на обнаружении флуоресцентных нуклеотидов, так как они включены в растущую цепь ДНК, которая дополняет секвенируемую матрицу. Существуют и другие методы быстрого высокопроизводительного секвенирования. Секвенирование белков может быть выполнено на опухолевых протеомах. Кроме того, масс-спектрометрия белков может быть использована для идентификации или подтверждения наличия мутированных пептидов, связанных с белками ГКГС, на опухолевых клетках. Пептиды могут быть элюированы кислотой из опухолевых клеток или из молекул HLA, которые иммунопреципитируют из опухоли, а затем идентифицированы с использованием масс-спектрометрии. Результаты секвенирования можно сравнить с известными контрольными наборами или с секвенированием, выполненным для нормальной ткани пациента.

Соответственно, данное изобретение относится к способам

идентификации и/или обнаружения неоэпитопов антигена, таких как Т-клеточные эпитопы. В частности, изобретение обеспечивает способ идентификации и/или обнаружения опухолеспецифических неоэпитопов, которые полезны для индукции опухолеспецифического иммунного ответа у субъекта. Необязательно, эти неоэпитопы связываются с белками HLA класса I с большей аффинностью, чем пептид дикого типа, и/или способны активировать противоопухолевые CD8 Т-клетки. Идентичные мутации в любом конкретном гене редко обнаруживаются в опухолях.

Белки ГКГС класса I присутствуют на поверхности практически всех клеток организма, включая большинство опухолевых клеток. Белки ГКГС класса I нагружены антигенами, которые обычно происходят из эндогенных белков или из патогенов, присутствующих в клетках, и затем представляются цитотоксическим Т-лимфоцитам (ЦТЛ). Т-клеточные рецепторы способны распознавать и связывать пептиды, образующие комплексы с молекулами ГКГС класса I. Каждый цитотоксический Т-лимфоцит экспрессирует уникальный Т-клеточный рецептор, который способен связывать специфические комплексы ГКГС/пептид.

Используя компьютерные алгоритмы, можно прогнозировать потенциальные неоэпитопы, такие как Т-клеточные эпитопы, то есть пептидные последовательности, которые связаны молекулами ГКГС класса I или класса II в форме пептид-презентирующего комплекса, и затем, в этой форме распознаются Т-клеточными рецепторами Т-лимфоцитов. Примеры программ, полезных для идентификации пептидов, которые будут связываться с ГКГС, включают, например: Lonza Epibase, SYFPEITHI (Rammensee et al., Immunogenetics, 50 (1999), 213-219) и HLA_BIND (Parker et al., J. Immunol., 152 (1994), 163-175).

Как только предполагаемые неоэпитопы выбраны, они могут быть дополнительно протестированы с использованием анализов in vitro и/или in vivo. Стандартные лабораторные анализы in vitro, такие как анализы методом иммуноферментных пятен, могут использоваться с изолятом от каждого пациента, чтобы уточнить перечень неоэпитопов, выбранных на основе алгоритма прогнозирования. Вакцины на основе неоэпитопов, способы их применения и способы их получения описаны в PCT/US2016/044918, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

Эндогенные опухолевые антигены

В другом варианте осуществления опухолевый антиген

представляет собой эндогенный опухолевый антиген, такой как опухолевый антиген, который высвобождается при разрушении опухолевых клеток in situ. В данной области техники установлено, что существуют естественные механизмы, которые приводят к гибели клеток in vivo, приводящей к высвобождению внутриклеточных компонентов, так что иммунный ответ может стимулироваться против внутриклеточных компонентов. Такие механизмы упоминаются в данном документе как иммуногенная клеточная гибель и включают некроптоз и пироптоз. Соответственно, в одном варианте осуществления конструкт иммуностимуляторной мРНК согласно раскрытию вводят субъекту, имеющему опухоль, в условиях, при которых происходит эндогенная иммуногенная клеточная гибель, так что высвобождается один или более эндогенных опухолевых антигенов, тем самым усиливая иммунный ответ против опухолевых антигенов. В одном варианте осуществления конструкт иммуностимуляторной мРНК вводят субъекту, имеющему опухоль, вместе со вторым конструктом мРНК, кодирующим «конструкт исполнительной мРНК», который стимулирует иммуногенную клеточную гибель опухолевых клеток у субъекта. Примеры конструктов исполнительной мРНК включают конструкты, кодирующие MLKL, RIPK3, RIPK1, DIABLO, FADD, GSDMD, каспазу-4, каспазу-5, каспазу-11, пирин, NLRP3 и ASC/PYCARD. Конструкты исполнительной мРНК и их применение в комбинации с конструктом иммуностимуляторной мРНК более подробно описаны в заявке США № 62/412,933, полное содержание которой специально включено в данный документ посредством ссылки.

Характеристика раковых антигенов

Пептиды с активирующей онкогенной мутацией, выбранные для включения в иммуномодулирующую терапевтическую композицию, обычно будут пептидами с высокой аффинностью связывания. В некотором аспекте пептид с активирующей онкогенной мутацией связывает белок HLA с большей аффинностью, чем пептид дикого типа. В некоторых вариантах осуществления пептиды с активирующей онкогенной мутацией имеют ИК50 по меньшей мере менее 5000 нМ, по меньшей мере менее 500 нМ, по меньшей мере менее 250 нМ, по меньшей мере менее 200 нМ, по меньшей мере менее 150 нМ, по меньшей мере менее 100 нМ, по меньшей мере менее 50 нМ или менее. Как правило, пептиды с прогнозированной ИК50 <50 нМ обычно рассматривают как пептиды со средней или высокой аффинностью связывания, и отбирают для проверки их аффинности

эмпирическим путем с использованием биохимических анализов связывания HLA.

В некоторых вариантах осуществления субъект-специфические пептиды с активирующей онкогенной мутацией могут быть идентифицированы в образце пациента. Например, образец может представлять собой образец ткань или образец опухоли. Например, образец одной или более опухолевых клеток может быть исследован на наличие субъект-специфических активирующих онкогенных мутаций. Образец опухоли может быть исследован с использованием анализа всего генома, экзома или транскриптома, чтобы идентифицировать субъект-специфические активирующие онкогенные мутации.

Альтернативно, субъект-специфические пептиды с активирующей онкогенной мутацией могут быть идентифицированы в экзосоме субъекта. Когда в экзосоме субъекта идентифицируют пептиды с активирующей онкогенной мутацией, считается, что такие пептиды являются репрезентативными для экзосомных пептидов субъекта.

Экзосомы представляют собой небольшие микровезикулы, выделяемые клетками, обычно имеющие диаметр приблизительно 30-100 нм. Экзосомы типично формируются из направленного внутрь выпячивания и отщепления мембраны поздней эндосомы, что приводит к образованию мультивезикулярного тельца (MVB), заполненного малыми билипидными пузырьками, каждый из которых содержит образец цитоплазмы исходной клетки. Слияние MVB с клеточной мембраной приводит к высвобождению этих экзосом из клетки и их доставке в кровь, мочу, спинномозговую жидкость или другие жидкости организма. Экзосомы могут быть извлечены из любой из этих биологических жидкостей для дальнейшего анализа.

Нуклеиновые кислоты в экзосомах играют роль биомаркеров опухолевых антигенов. Преимущество анализа экзосом с целью выявления специфических для рака антигенов субъекта заключается в том, что этот способ позволяет обойтись без биопсии. Это может быть особенно полезно, когда пациенту необходимо пройти несколько циклов терапии, включая идентификацию раковых антигенов и вакцинацию.

В данной области техники был описан ряд способов выделения экзосом из биологического образца. Например, могут быть использованы следующие способы: дифференциальное центрифугирование, низкоскоростное центрифугирование, анионообменная и/или гель-проникающая хроматография,

центрифугирования в градиенте плотности сахарозы или электрофорез органелл, сортировка магнитно-активированных клеток (MACS), концентрирование ультрафильтрацией с использованием наномембраны, выделение в градиенте плотности перколла и использование микрофлюидного устройства. Иллюстративные способы описаны, например, в публикации патента США № 2014/0212871.

**Иммуностимуляторные мРНК**

Один аспект раскрытия относится к мРНК, которые кодируют полипептид, который стимулирует или усиливает иммунный ответ против одного или более представляющих интерес антигенов (пептид(ы) с активирующей онкогенной мутацией). Такие мРНК, которые усиливают иммунные ответы на представляющие интерес антиген(ы), упоминаются в данном документе как конструкты иммуностимуляторных мРНК или иммуностимуляторные мРНК, включая химически модифицированные мРНК (ммРНК). В некоторых аспектах раскрытие обеспечивает мРНК, кодирующую полипептид, который стимулирует или усиливает иммунный ответ у субъекта, нуждающегося в этом (например, потенцирует иммунный ответ у субъекта), например, индуцируя адаптивный иммунитет (например, посредством стимуляции продукции интерферона типа I), стимулируя воспалительный ответ, стимулируя сигнальный путь NFkB и/или стимулируя развитие, активность или мобилизацию дендритных клеток (ДК) у субъекта. В некоторых аспектах введение иммуностимуляторной мРНК нуждающемуся в этом субъекту усиливает клеточный иммунитет (например, Т-клеточный иммунитет), гуморальный иммунитет (например, В-клеточный иммунитет) или как клеточный, так и гуморальный иммунитет у субъекта. В некоторых аспектах введение иммуностимуляторной мРНК стимулирует продукцию цитокинов (например, продукцию воспалительных цитокинов), стимулирует антигенспецифические ответы эффекторных $CD8^+$ клеток, стимулирует антигенспецифические ответы $CD4^+$ клеток-хелперов, увеличивает популяцию эффекторных $CD62L^{lo}$ Т-клеток памяти, стимулирует активность В-клеток или стимулирует продукцию антигенспецифических антител, включая комбинации вышеуказанных ответов.

В некоторых аспектах введение иммуностимуляторной мРНК стимулирует продукцию цитокинов (например, продукцию воспалительных цитокинов) и стимулирует антигенспецифические ответы $CD8^+$ эффекторных клеток. В некоторых аспектах введение иммуностимуляторной мРНК стимулирует продукцию цитокинов

(например, продукцию воспалительных цитокинов) и стимулирует антигенспецифические ответы $CD4^+$ клеток-хелперов. В некоторых аспектах введение иммуностимуляторной мРНК стимулирует продукцию цитокинов (например, продукцию воспалительных цитокинов) и увеличивает популяцию эффекторных $CD62L^{lo}$ Т-клеток памяти. В некоторых аспектах введение эффекторной мРНК стимулирует продукцию цитокинов (например, продукцию воспалительных цитокинов) и стимулирует активность В-клеток или стимулирует продукцию антигенспецифических антител.

Иммуностимуляторные мРНК, которые стимулируют интерферон типа I

В некоторых аспектах раскрытие обеспечивает иммуностимуляторную мРНК, кодирующую полипептид, который стимулирует или усиливает иммунный ответ против представляющего интерес антигена путем стимуляции или усиления сигнального пути интерферона типа I, тем самым стимулируя или усиливая продукцию интерферона типа I (ИФН). Было установлено, что для успешной индукции противоопухолевого или противомикробного адаптивного иммунитета требуется сигналинг ИФН типа I (см., например, Fuertes, M.B. et al. (2013) *Trends Immunol.* 34:67-73). Продукция ИФН типа I (включая ИФН-α, ИФН-β, ИФН-ε, ИФН-к и ИФН-ω) играет роль в устранении микробных инфекций, таких как вирусные инфекции. Также было оценено, что ДНК клетки-хозяина (например, полученная из поврежденных или умирающих клеток) способна индуцировать продукцию интерферона типа I и что сигнальный путь ИФН I типа играет роль в развитии адаптивного противоопухолевого иммунитета. Тем не менее, многие патогены и раковые клетки развили механизмы для снижения или ингибирования ответов интерферона I типа. Таким образом, активация (включая стимуляцию и/или усиление) сигнального пути ИФН типа I у субъекта, нуждающегося в этом, путем обеспечения иммуностимуляторной мРНК согласно раскрытию субъекту стимулирует или усиливает иммунный ответ у субъекта в широком диапазоне клинических ситуаций, включая лечение рака и патогенных инфекций, а также для потенцирования ответов на вакцину для обеспечения защитного иммунитета.

Интерфероны типа I (ИФН) представляют собой провоспалительные цитокины, которые быстро продуцируются во множестве различных типов клеток, обычно при вирусной инфекции, и, как известно, обладают широким спектром эффектов.

Классическими последствиями продукции ИФН типа I *in vivo* являются активация антимикробных клеточных программ и развитие врожденных и адаптивных иммунных ответов. ИФН типа I индуцирует внутреннее антимикробное состояние клеток в инфицированных и соседних клетках, что ограничивает распространение инфекционных агентов, особенно вирусных патогенов. ИФН типа I также модулирует активацию врожденных иммунных клеток (например, созревание дендритных клеток), чтобы способствовать презентации антигена и функциям натуральных клеток-киллеров. ИФН типа I также способствует развитию высокоаффинных антигенспецифических Т- и В-клеточных ответов и иммунологической памяти (Ivashkiv and Donlin (2014) *Nat Rev Immunol* 14(1):36-49).

ИФН типа I активирует дендритные клетки (ДК) и повышает их способность стимулировать Т-клетки посредством аутокринного сигналинга (Montoya et al., (2002) *Blood* 99:3263-3271). Воздействие ИФН типа I облегчает созревание ДК посредством увеличения экспрессии хемокиновых рецепторов и молекул адгезии (например, для стимуляции миграции ДК в дренирующие лимфатические узлы), костимулирующих молекул и презентации антигенов ГКГС класса I и класса II. ДК, которые созревают после воздействия ИФН типа I, могут эффективно стимулировать защитные Т-клеточные ответы (Wijesundara et al., (2014) Front Immunol 29(412) и ссылки в нем).

ИФН типа I может стимулировать или ингибировать активацию, пролиферацию, дифференцировку и выживание Т-клеток, в значительной степени зависящие от времени сигналинга ИФН типа I относительно сигналинга Т-клеточных рецепторов (Crouse et al., (2015) *Nat Rev Immunol* 15:231-242). Ранние исследования показали, что экспрессия ГКГС-I повышается в ответ на ИФН типа I во множестве типов клеток (Lindahl et al., (1976), *J Infect Dis* 133(Suppl):A66-A68; Lindahl et al., (1976) *Proc Natl Acad Sci USA* 17:1284-1287), что является необходимым условием для оптимальной стимуляции, дифференцировки, размножения и цитолитической активности Т-клеток. ИФН типа I может оказывать мощные костимулирующие эффекты на CD8 Т-клетки, усиливая пролиферацию и дифференцировку CD8 Т-клеток (Curtsinger et al., (2005) *J Immunol* 174:4465-4469; Kolumam et al., (2005) *J Exp Med* 202:637-650).

Подобно воздействиям на Т-клетки, сигналинг ИФН типа I оказывает как положительное, так и отрицательное влияние на В-

клеточные ответы в зависимости от времени и контекста воздействия (Braun et al., (2002) *Int Immunol* 14(4):411-419; Lin et al, (1998) 187(1):79-87). Сигналинг ИФН типа I может ингибировать выживаемость и созревание незрелых В-клеток В отличие от незрелых В-клеток, воздействие ИФН типа I способствует активации В-клеток, продукции антител и переключению изотипа после вирусной инфекции или после экспериментальной иммунизации (Le Bon et al., (2006) *J Immunol* 176:4:2074-2078; Swanson et al., (2010) J Exp Med 207:1485-1500).

Был установлен ряд компонентов, участвующих в сигналинге ИФН типа I, включая STING, регуляторные факторы интерферонов, такие как IRF1, IRF3, IRF5, IRF7, IRF8, и IRF9, TBK1, IKKi, MyD88 и TRAM. Дополнительные компоненты, участвующие в сигнальном пути ИФН типа I, включают TRAF3, TRAF6, IRAK-1, IRAK-4, TRIF, IPS-1, TLR-3, TLR-4, TLR-7, TLR-8, TLR-9, RIG-1, DAI и IFI16.

Соответственно, в одном варианте осуществления иммуностимуляторная мРНК кодирует любой из вышеупомянутых компонентов, участвующих в сигнальном пути ИФН типа I.

*Иммуностимуляторная мРНК, кодирующая STING*

Данное раскрытие охватывает мРНК (включая ммРНК), кодирующую STING, включая конститутивно активные формы STING, в качестве иммуностимуляторов. STING (стимулятор генов интерферона; также известный как трансмембранный белок 173 (TMEM173), медиатор активации IRF3 (MITA), метионин-пролин-тирозин-серин (MPYS) и стимулятор ИФН ЭР (ERIS)) представляет собой 379 аминокислот, резидентный трансмембранный белок эндоплазматического ретикулума (ЭР), который функционирует как сигнальная молекула, контролирующая транскрипцию генов иммунного ответа, включая ИФН I типа и провоспалительные цитокины (Ishikawa & Barber, (2008) *Nature* 455:647-678; Ishikawa et al., (2009) *Nature* 461:788-792; Barber (2010) *Nat Rev Immunol* 15(12):760-770).

STING функционирует как сигнальный адаптер, связанный с цитозольным обнаружением ДНК в отношении сигнальной оси TBK1/IRF3/ИФН типа I. Функции сигнального адаптера STING активируются посредством прямого распознавания циклических динуклеотидов (CDN). Примеры CDN включают циклический ди-ГМФ (гуанозин-5'-монофосфат), циклический ди-АМФ (аденозин-5'-

монофосфат) и циклический ГМФ-АМФ (cGAMP). CDN, изначально характеризуемые как повсеместно распространенные бактериальные вторичные мессенджеры, в настоящее время известны как класс патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP), которые активируют сигнальную ось TBK1/IRF3/ИФН типа I посредством прямого взаимодействия со STING. STING способен распознавать аберрантные виды ДНК и/или CDN в цитозоле клетки, включая CDN, полученные от бактерий, и/или от белка циклической ГМФ-АМФ-синтазы (cGAS) хозяина. Белок cGAS представляет собой ДНК-сенсор, который вырабатывает cGAMP в ответ на обнаружение ДНК в цитозоле (Burdette et al., (2011) *Nature* 478:515-518; Sun et al., (2013) *Science* 339:786-791; Diner et al., (2013) *Cell Rep* 3:1355-1361; Ablasser et al., (2013) *Nature* 498:380-384).

При связывании с CDN, STING димеризуется и подвергается конформационному изменению, которое способствует образованию комплекса с TANK-связывающей киназой 1 (TBK1) (Ouyang et al., (2012) *Immunity* 36(6):1073-1086). Этот комплекс транслоцируется в перинуклеарное пространство Гольджи, что приводит к доставке TBK1 в эндолизосомные компартменты, где он фосфорилирует факторы транскрипции IRF3 и NF-κB (Zhong et al., (2008) *Immunity* 29:538-550). Недавнее исследование показало, что STING функционирует как каркас, связываясь как с TBK1, так и с IRF3, чтобы специфически стимулировать фосфорилирование IRF3 с помощью TBK1 (Tanaka & Chen, (2012) *Sci Signal* 5(214):ra20). Активация IRF3-, IRF7- и NF-κB-зависимых сигнальных путей индуцирует продукцию цитокинов и других белков, связанных с иммунным ответом, таких как ИФН типа I, которые стимулируют антипатогенную и/или противоопухолевую активность.

В ряде исследований было исследовано использование CDN-агонистов STING в качестве потенциальных вакцинных адъювантов или иммуномодулирующих агентов для вызова гуморальных и клеточных иммунных ответов (Dubensky et al., (2013) *Ther Adv Vaccines* 1(4):131-143 и ссылки в нем). Первоначальные исследования показали, что введение CDN, ц-ди-ГМФ, ослабляет инфекцию *Staphylococcus aureus in vivo*, сокращая количество восстановленных бактериальных клеток в мышиной модели инфекции, однако ц-ди-ГМФ не оказывал заметного ингибирующего или бактерицидного действия на бактериальные клетки *in vitro*, что указывает на то, что сокращение бактериальных клеток было связано с влиянием на иммунную систему хозяина (Karaolis et al.,

(2005) *Antimicrob Agents Chemother* 49:1029-1038; Karaolis et al., (2007) *Infect Immun* 75:4942-4950). Недавние исследования показали, что синтетические молекулы производные CDN, объединенные с противораковыми вакцинами, продуцирующими гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) (называемые STINGVAX), вызывают усиление противоопухолевых эффектов *in vivo* на терапевтических животных моделях рака по сравнению с иммунизацией только вакциной, продуцирующей ГМ-КСФ (Fu et al., (2015) *Sci Transl Med* 7(283):283ra52), что указывает на то, что CDN являются сильными вакцинными адъювантами.

Описаны мутантные белки STING, возникающие в результате полиморфизмов, картированных с геном *TMEM173* человека, проявляющих мутацию с приобретением функции или конститутивно активный фенотип. Было показано, что при экспрессии *in vitro* мутантные аллели STING эффективно стимулируют индукцию ИФН типа I (Liu et al., (2014) *N Engl J Med* 371:507-518; Jeremiah et al., (2014) *J Clin Invest* 124:5516-5520; Dobbs et al., (2015) *Cell Host Microbe* 18(2):157-168; Tang & Wang, (2015) *PLoS ONE* 10(3):e0120090; Melki et al., (2017) *J Allergy Clin Immunol* In Press; Konig et al., (2017) *Ann Rheum Dis* 76(2):468-472; Burdette et al. (2011) *Nature* 478:515-518).

В данном документе предложены мРНК (например, ммРНК), кодирующие конститутивно активные формы STING, включая мутантные изоформы STING человека, для применения в качестве иммуностимуляторов, как описано в данном документе. В данном документе приведены в Перечне последовательностей ммРНК, кодирующие конститутивно активные формы STING, включая мутантные изоформы STING человека. Нумерация аминокислотных остатков для мутантных полипептидов STING человека, используемых в данном документе, соответствует нумерации, используемой для 379 аминокислотных остатков человеческого STING дикого типа (изоформа 1), доступных в данной области техники под номером доступа в базе данных Genbank NP_938023.

Соответственно, в одном аспекте раскрытие обеспечивает мРНК (например, ммРНК), кодирующую мутантный белок STING человека, имеющий мутацию по аминокислотному остатку 155, в частности аминокислотную замену, такую как мутация V155M. В одном варианте осуществления мРНК (например, ммРНК) кодирует аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления мутант STING V155M кодируется нуклеотидной

последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 168 или SEQ ID NO: 170. В одном варианте осуществления мРНК (например, ммРНК) содержит последовательность 3’- НТО, как показано в SEQ ID NO: 149, которая содержит сайт связывания miR122.

В других аспектах раскрытие обеспечивает мРНК (например, ммРНК), кодирующей мутантный белок STING человека, имеющий мутацию в аминокислотном остатке 284, такую как аминокислотная замена. Неограничивающие примеры остатков 284 замен включают R284T, R284M и R284K. В некоторых вариантах осуществления мутантный белок STING человека имеет мутацию R284T, например, имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2, или кодируется нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 140 или 201. В некоторых вариантах осуществления мутантный белок STING человека имеет мутацию R284M, например, имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3, или кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 141 или 202. В некоторых вариантах осуществления мутантный белок STING человека имеет мутацию R284K, например, имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4 или 164, или кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 142, 165, 203 или 225.

В других аспектах раскрытие обеспечивает мРНК (например, ммРНК), кодирующую мутантный белок STING человека, имеющий мутацию в аминокислотном остатке 154, такую как аминокислотная замена, такую как мутация N154S. В некоторых вариантах осуществления мутантный белок STING человека имеет мутацию N154S, например, имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5, или кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 143 или 204.

В еще других аспектах раскрытие обеспечивает мРНК (например, ммРНК), кодирующую мутантный белок STING человека, имеющий мутацию в аминокислотном остатке 147, такую как аминокислотная замена, такую как мутация V147L. В некоторых вариантах осуществления мутантный белок STING человека, имеющий мутацию V147L, имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6, или кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 144 или 205.

В других аспектах раскрытие обеспечивает мРНК (например,

ммРНК), кодирующую мутантный белок STING человека, имеющий мутацию в аминокислотном остатке 315, такую как аминокислотная замена, такую как мутация E315Q. В некоторых вариантах осуществления мутантный белок STING человека, имеющий мутацию E315Q, имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 7, или кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 145 или 206.

В других аспектах раскрытие обеспечивает мРНК (например, ммРНК), кодирующую мутантный белок STING человека, имеющий мутацию в аминокислотном остатке 375, такую как аминокислотная замена, такую как мутация R375A. В некоторых вариантах осуществления мутантный белок STING человека, имеющий мутацию R375A, имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 8, или кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 146 или 207.

В других аспектах раскрытие обеспечивает мРНК (например, ммРНК), кодирующую мутантный белок STING человека, имеющий одну или более, или комбинацию из двух, трех, четырех или более из вышеупомянутых мутаций. Соответственно, в одном аспекте раскрытие обеспечивает мРНК (например, ммРНК), кодирующую мутантный белок STING человека, имеющий одну или более мутаций, выбранных из группы, состоящей из: V147L, N154S, V155M, R284T, R284M, R284K, E315Q и R375A, и их комбинации. В других аспектах раскрытие обеспечивает мРНК (например, ммРНК), кодирующую мутантный белок STING человека, имеющий комбинацию мутаций, выбранных из группы, состоящей из: V155M и R284T; V155M и R284M; V155M и R284K; V155M и V147L; V155M и N154S; V155M и E315Q; и V155M и R375A.

В других аспектах раскрытие обеспечивает мРНК (например, ммРНК), кодирующую мутантный белок STING человека, имеющий V155M и одну, две, три или более из следующих мутаций: R284T; R284M; R284K; V147L; N154S; E315Q; и R375A. В других аспектах раскрытие обеспечивает мРНК (например, ммРНК), кодирующую мутантный белок STING человека, имеющий мутации V155M, V147L и N154S. В других аспектах раскрытие обеспечивает мРНК (например, ммРНК), кодирующую мутантный белок STING человека, имеющий мутации V155M, V147L, N154S и, необязательно, мутацию в аминокислоте 284. В еще других аспектах раскрытие обеспечивает к мРНК (например, ммРНК), кодирующую мутантный белок STING человека, имеющий мутации V155M, V147L, N154S и мутацию в аминокислоте

284, выбранную из R284T, R284M и R284K. В других аспектах раскрытие обеспечивает мРНК (например, ммРНК), кодирующую мутантный белок STING человека, имеющий мутации V155M, V147L, N154S, и R284T. В других аспектах раскрытие обеспечивает мРНК (например, ммРНК), кодирующую мутантный белок STING человека, имеющий мутации V155M, V147L, N154S, и R284M. В других аспектах раскрытие обеспечивает мРНК (например, ммРНК), кодирующую мутантный белок STING человека, имеющий мутации V155M, V147L, N154S, и R284K.

В других вариантах осуществления раскрытие обеспечивает мРНК (например, ммРНК), кодирующую мутантный белок STING человека, имеющий комбинацию мутаций в аминокислотном остатке 147, 154, 155 и, необязательно, 284, в частности, аминокислотных замен, таких как V147L, N154S, V155M и, необязательно, R284M. В некоторых вариантах осуществления мутантный белок STING человека имеет мутации V147N, N154S и V155M, такие как аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO: 9, или кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 147. В некоторых вариантах осуществления мутантный белок STING человека имеет мутации R284M, V147N, N154S и V155M, такие как аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO: 10, или кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 148 или 209.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает мРНК (например, ммРНК), кодирующую мутантный белок STING человека, который представляет собой конститутивно активную усеченную форму полноразмерного белка дикого типа из 379 аминокислот, такого как конститутивно активный полипептид STING человека, состоящий из аминокислот 137-379.

*Иммуностимуляторная мРНК, кодирующая регуляторный фактор интерферона (IRF)*

Данное раскрытие обеспечивает мРНК (включая ммРНК), кодирующую регуляторные факторы интерферона, такие как IRF1, IRF3, IRF5, IRF7, IRF8 и IRF9 в качестве иммуностимуляторов. Семейство факторов транскрипции IRF участвует в регуляции экспрессии генов, что приводит к продукции интерферонов I типа (ИФН) во время врожденных иммунных ответов. На сегодняшний день идентифицировано девять IRF человека (IRF-1-IRF-9), причем каждый член семейства обладает обширной гомологией последовательностей в своих N-концевых связывающих доменах (DBD)

(Mamane et al., (1999) *Gene* 237:1-14; Taniguchi et al., (2001) *Annu Rev Immunol* 19:623-655). В семействе IRF IRF1, IRF3, IRF5 и IRF7 специфически участвуют в качестве позитивных регуляторов транскрипции гена ИФН типа I (Honda et al., (2006) *Immunity* 25(3):349-360). IRF1 был первым членом семейства, для которого обнаружили, что он активирует промоторы гена ИФН типа I (Miyamoto et al., (1988) *Cell* 54:903-913). Хотя исследования демонстрируют, что IRF1 участвует в экспрессии гена ИФН типа I, нормальная индукция ИФН типа I наблюдалась в инфицированных вирусом *IRF1*-/- мышиных фибробластах, что свидетельствует об их заменимости (Matsuyama et al., (1993) *Cell* 75:83-97). Было также показано, что IRF5 не является обязательным для индукции ИФН типа I вирусами или агонистами TLR (Takaoka et al., (2005) *Nature* 434:243-249).

Соответственно, в некоторых аспектах раскрытие обеспечивает мРНК, кодирующую конститутивно активные формы IRF1, IRF3, IRF5, IRF7, IRF8 и IRF9 человека в качестве иммуностимуляторов. В некоторых аспектах раскрытие обеспечивает мРНК, кодирующую конститутивно активные формы человеческого IRF3 и/или IRF7.

Во время врожденных иммунных ответов IRF-3 играет критическую роль в ранней индукции ИФН типа I. Фактор транскрипции IRF3 конститутивно экспрессируется и перемещается между ядром и цитоплазмой клеток в латентной форме с преимущественно цитозольной локализацией до фосфорилирования (Hiscott (2007) *J Biol Chem* 282(21):15325-15329; Kumar et al., (2000) *Mol Cell Biol* 20(11):4159-4168). После фосфорилирования сериновых остатков на С-конце с помощью TBK-1 (TANK-связывающая киназа 1; также известная как T2K и NAK) и/или IKKε (индуцибельная IκB-киназа; также известная как IKKi), IRF3 транслоцируется из цитоплазмы в ядро (Fitzgerald et al., (2003) *Nat Immuno* 4(5):491-496; Sharma et al., (2003) *Science* 300:1148-1151; Hemmi et al., (2004) *J Exp Med* 199:1641-1650). Транскрипционная активность IRF3 опосредуется этими событиями фосфорилирования и транслокации. Модель для активации IRF3 предполагает, что С-концевое фосфорилирование вызывает конформационное изменение в IRF3, которое способствует гомо- и/или гетеродимеризации (например, с IRF7; см. Honda et al., (2006) *Immunity* 25(3):346-360), ядерной локализации и ассоциации с транскрипционными коактиваторами CBP и/или p300 (Lin et al., (1999) *Mol Cell Biol* 19(4):2465-2474). В то время как неактивный

IRF3 конститутивно перемещается в и из ядра, фосфорилированные белки IRF3 остаются связанными с CBP и/или p300, сохраняются в ядре и индуцируют транскрипцию ИФН и других генов (Kumar et al., (2000) *Mol Cell Biol* 20(11):4159-4168).

В отличие от IRF3, IRF7 демонстрирует низкий уровень экспрессии в большинстве клеток, но сильно индуцируется сигналингом, опосредованным ИФН типа I, подтверждая мнение, что IRF3 в первую очередь ответственен за раннюю индукцию генов ИФН и что IRF7 участвует в поздней фазе индукции (Sato et al., (2000) *Immunity* 13(4):539-548). Связывание лиганда с рецептором ИФН типа I приводит к активации гетеротримерного активатора транскрипции, называемого ИФН-стимулируемым генным фактором 3 (ISGF3), который состоит из IRF9, STAT1 и STAT2 и отвечает за индукцию гена IRF7 (Marie et al., (1998) *EMBO J* 17(22):6660-6669). Как и IRF3, IRF7 может делиться между цитоплазмой и ядром после серинового фосфорилирования его C-концевой области, что обеспечивает его димеризацию и ядерную транслокацию. IRF7 образует гомодимер или гетеродимер с IRF3, и каждый из этих разных димеров по-разному действует на членов семейства генов ИФН типа I. IRF3 более сильным в активации гена ИФН-β, чем генов ИФН-α, тогда как IRF7 эффективно активирует гены ИФН-α и ИФН-β (Marie et al., (1998) *EMBO J* 17(22):6660-6669).

В данном документе предложены мРНК (например, ммРНК), кодирующие конститутивно активные формы IRF3 и IRF7, включая мутантные изоформы IRF3 человека и IRF7 человека, для применения в качестве иммуностимуляторов, как описано в данном документе. В данном документе в Перечне последовательностей приведены мРНК (например, ммРНК), кодирующие конститутивно активные формы IRF3 и IRF7, включая мутантные человеческие изоформы IRF3 и IRF7. Нумерация аминокислотных остатков для мутантных полипептидов IRF3 человека, используемых в данном документе, соответствует нумерации, используемой для 427 аминокислотных остатков человеческого IRF3 дикого типа (изоформа 1), доступных в данной области техники под номером доступа в базе данных Genbank NP_001562. Нумерация аминокислотных остатков для мутантных полипептидов IRF7 человека, используемых в данном документе, соответствует нумерации, используемой для 503 аминокислотных остатков человеческого IRF7 дикого типа (изоформа a), доступных в данной области техники под номером доступа в базе данных Genbank NP_001563.

Соответственно, в некоторых аспектах раскрытие обеспечивает мРНК (например, ммРНК), кодирующую мутантный белок IRF3 человека, который является конститутивно активным, например, имеющий мутацию в аминокислотном остатке 396, такую как аминокислотная замена, такую как мутация S396D, например, как указано в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, или кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 151 или 212. В других аспектах конструкт мРНК (например, ммРНК) кодирует конститутивно активный полипептид мышиного IRF3, содержащий мутацию S396D, например, как указано в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11, или кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 150 или 211.

В других аспектах раскрытие обеспечивает мРНК (например, ммРНК), кодирующую мутантный белок IRF7 человека, который является конститутивно активным. В одном аспекте раскрытие обеспечивает мРНК (например, ммРНК), кодирующую конститутивно активный белок IR7, содержащий одну или более точечных мутаций (аминокислотные замены по сравнению с белком дикого типа). В других аспектах раскрытие обеспечивает мРНК (например, ммРНК), кодирующую конститутивно активный белок IR7, содержащий усеченную форму белка (аминокислотные делеции по сравнению с диким типом). В еще других аспектах раскрытие обеспечивает мРНК (например, ммРНК), кодирующую конститутивно активный белок IR7, содержащий усеченную форму белка, которая также содержит одну или более точечных мутаций (комбинация аминокислотных делеций и аминокислотных замен по сравнению с белком дикого типа).

Аминокислотная последовательность дикого типа человеческого IRF7 (изоформа a) указана в SEQ ID NO: 13, или кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 152 или 213. Был получен ряд конститутивно активных форм человеческого IRF7, содержащий точечные мутации, делеции или и те и другие, по сравнению с последовательностью дикого типа. В одном аспекте раскрытие обеспечивает конструкт имуностимуляторной мРНК, кодирующий конститутивно активный полипептид IRF7, содержащий одну или более из следующих мутаций: S475D, S476D, S477D, S479D, L480D, S483D и S487D, и их комбинации. В других аспектах раскрытие обеспечивает мРНК (например, ммРНК), кодирующую конститутивно активный полипептид IRF7, содержащий мутации S477D и S479D, как указано в

аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, или кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 153 или 214. В другом аспекте раскрытие обеспечивает мРНК (например, ммРНК), кодирующую конститутивно активный полипептид IRF7, содержащий мутации S475D, S477D и L480D, как указано в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15, или кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 154 или 215. В других аспектах раскрытие обеспечивает мРНК (например, ммРНК) кодирующую конститутивно активный полипептид IRF7, содержащий мутации S475D, S476D, S477D, S479D, S483D и S487D, как указано в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16, или кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 155 или 216. В другом аспекте раскрытие обеспечивает мРНК (например, ммРНК), кодирующую конститутивно активный полипептид IRF7, содержащий делецию аминокислотных остатков 247–467 (т.е. содержащий аминокислотные остатки 1–246 и 468–503), как указано в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17, или кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 156 или 217. В еще других аспектах раскрытие обеспечивает мРНК (например, ммРНК), кодирующую конститутивно активный полипептид IRF7, содержащий делецию аминокислотных остатков 247–467 (т.е. содержащий аминокислотные остатки 1–246 и 468–503) и дополнительно содержащий мутации S475D, S476D, S477D, S479D, S483D и S487D, как указано в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18, или кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 157 или 218.

В других аспектах раскрытие обеспечивает мРНК (например, ммРНК), кодирующую усеченный неактивный «нулевой» полипептидный конструкт IRF7, содержащий делецию остатков 152–246 (т.е. содержащий аминокислотные остатки 1–151 и 247–503), как указано в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19, или кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 158 или 219 (используется, например, для целей контроля). В других аспектах раскрытие обеспечивает мРНК (например, ммРНК), кодирующую усеченный неактивный «нулевой» полипептидный конструкт IRF7, содержащий делецию остатков 1–151 (т.е. содержащий аминокислотные остатки 152–503), как указано в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20, или кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:

159 или 220 (используется, например, для целей контроля).

*Дополнительные иммуностимуляторные мРНК, которые активируют ИФН типа I*

В дополнение к конструктам мРНК STING и IRF, описанным выше, раскрытие обеспечивает конструкты мРНК, кодирующие дополнительные компоненты сигнального пути ИФН типа I, которые можно использовать в качестве иммуностимуляторов для усиления иммунных ответов посредством активации сигнального пути ИФН типа I. Например, в одном варианте осуществления конструкт иммуностимуляторной мРНК кодирует белок MyD88. В данной области техники известно, что MyD88 передает сигнал дальше в направлении от IRF7. В одном аспекте раскрытие обеспечивает мРНК (например, ммРНК), кодирующую конститутивно активный белок MyD88, такой как мутантный белок MyD88, имеющий одну или более точечных мутаций. В одном аспекте раскрытие обеспечивает мРНК (например, ммРНК), кодирующую мутантный человеческий или мышиный белок MyD88, имеющий замены L265P, как указано в SEQ ID NO: 75 и 76, соответственно.

В другом аспекте конструкт иммуностимуляторной мРНК кодирует белок TRAM (TICAM2). В данной области техники известно, что TRAM передает сигнал дальше IRF3. В одном аспекте раскрытие охватывает мРНК (например, ммРНК), кодирующую конститутивно активный белок TRAM, такой как мутантный белок TRAM, имеющий одну или более точечных мутаций. В другом аспекте раскрытие охватывает белок TRAM дикого типа, который сверхэкспрессируется. В одном аспекте раскрытие обеспечивает мРНК (например, ммРНК), кодирующую мышиный белок TRAM, как показано в SEQ ID NO: 77.

В еще других аспектах раскрытие обеспечивает конструкт иммуностимуляторной мРНК, кодирующей TANK-связывающую киназу 1 (TBK1) или индуцибельную IκB-киназу (IKKi, также известную как IKKε), включая конститутивно активные формы TBK1 или IKKi, в качестве иммуностимуляторов. Было показано, что TBK1 и IKKi являются компонентами активируемой вирусом киназы, которая фосфорилирует IRF3 и IRF7, таким образом, действуя выше в направлении от IRF3 и IRF7 в сигнальном пути ИФН типа I (Sharma, S. et al. (2003) *Science* 300:1148-1151). TBK1 и IKKi участвуют в фосфорилировании и активации факторов транскрипции (например, IRF3/7 и NF-κB), которые индуцируют экспрессию генов ИФН типа I, а также генов, индуцируемых ИФН. (Fitzgerald, K.A. et al., (2003) *Nat Immunol* 4(5):491-496).

Соответственно, в одном аспекте раскрытие обеспечивает конструкт иммуностимуляторной мРНК, которая кодирует белок TBK1, включая конститутивно активную форму TBK1, включая мутантные изоформы TBK1 человека. В еще других аспектах конструкт иммуностимуляторной мРНК кодирует белок IKKi, включая конститутивно активную форму IKKi, включая мутантные изоформы IKKi человека.

Иммуностимуляторные мРНК, которые стимулируют воспалительные ответы

В других аспектах раскрытие обеспечивает конструкты иммуностимуляторных мРНК, которые усиливают иммунный ответ путем стимуляции воспалительного ответа. Неограничивающие примеры агентов, которые стимулируют воспалительный ответ, включают STAT1, STAT2, STAT4 и STAT6. Соответственно, раскрытие обеспечивает конструкт иммуностимуляторной мРНК, кодирующий один или комбинацию этих индуцирующих воспаление белков, включая конститутивно активную форму.

В данном документе предложены мРНК (например, ммРНК), кодирующие конститутивно активные формы STAT6, включая мутантные изоформы STAT6 человека, для применения в качестве иммуностимуляторов, как описано в данном документе. В данном документе в Перечне последовательностей приведены мРНК (например, ммРНК), кодирующие конститутивно активные формы STAT6, включая мутантные человеческие изоформы STAT6. Нумерация аминокислотных остатков для мутантных полипептидов STAT6 человека, используемых в данном документе, соответствует нумерации, используемой для 847 аминокислотных остатков человеческого STAT6 дикого типа (изоформа 1), доступных в данной области техники под номером доступа в базе данных Genbank NP_001171550.1.

В одном варианте осуществления раскрытие обеспечивает конструкт мРНК, кодирующий конститутивно активный конструкт STAT6 человека, содержащий одну или более аминокислотных мутаций, выбранных из группы, состоящей из S407D, V547A, T548A, Y641F и их комбинаций. В другом варианте осуществления конструкт мРНК кодирует конститутивно активный конструкт STAT6 человека, содержащий мутации V547A и T548A, такой как последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 78. В другом варианте осуществления конструкт мРНК кодирует конститутивно активный конструкт STAT6 человека, содержащий мутацию S407D, такой как

последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 79. В другом варианте осуществления конструкт мРНК кодирует конститутивно активный конструкт STAT6 человека, содержащий мутации S407D, V547A и T548A, такой как последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 80. В другом варианте осуществления конструкт мРНК кодирует конститутивно активный конструкт STAT6 человека, содержащий мутации V547A, T548A и Y641F, такие как последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 81.

Иммуностимуляторные мРНК, которые стимулируют сигналинг NFkB

В других аспектах раскрытие обеспечивает конструкты иммуностимуляторных мРНК, которые усиливают иммунный ответ посредством стимуляции сигналинга NFkB, который, как известно, участвует в стимуляции иммунного ответа. Неограничивающие примеры белков, которые стимулируют сигналинг NFkB, включают c-FLIP, IKKβ, RIPK1, Btk и TAK-TAB1. Соответственно, конструкт иммуностимуляторной мРНК согласно раскрытию может кодировать любой из этих белков, индуцирующих путь NFkB, например, в конститутивно активной форме.

В одном варианте осуществления раскрытие обеспечивает конструкт иммуностимуляторной мРНК, которая активирует сигналинг NFkB, кодирует белок c-FLIP (клеточный белок, ингибирующий каспазу 8 (FLICE)) (также известный в данной области техники как CASP8 и FADD-подобный регулятор апоптоза), включая конститутивно активный c-FLIP. В данном документе предложены мРНК (например, ммРНК), кодирующие конститутивно активные формы c-FLIP, включая мутантные изоформы c-FLIP человека, для применения в качестве иммуностимуляторов, как описано в данном документе. В данном документе в Перечне последовательностей приведены мРНК (например, ммРНК), кодирующие конститутивно активные формы c-FLIP, включая мутантные человеческие изоформы c-FLIP. Нумерация аминокислотных остатков для мутантных полипептидов c-FLIP человека, используемых в данном документе, соответствует нумерации, используемой для 480 аминокислотных остатков человеческого c-FLIP дикого типа (изоформа 1), доступных в данной области техники под номером доступа в базе данных Genbank NP_003870.

В одном варианте осуществления мРНК кодирует длинную (L) изоформу c-FLIP, содержащую два домена DED, домен p20 и домен p12, такую как имеющую последовательность, приведенную в SEQ ID

NO: 82. В другом варианте осуществления мРНК кодирует короткую (S) изоформу c-FLIP, кодирующую аминокислоты 1-227, содержащую два домена DED, такую как имеющую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 83. В другом варианте осуществления мРНК кодирует продукт расщепления c-FLIP p22, кодирующий аминокислоты 1-198, такой как имеющий последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 84. В другом варианте осуществления мРНК кодирует продукт расщепления c-FLIP p43, кодирующий аминокислоты 1-376, такой как имеющий последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 85. В другом варианте осуществления мРНК кодирует продукт расщепления c-FLIP p12, кодирующий аминокислоты 377-480, такой как имеющий последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 86.

В другом варианте осуществления конструкт иммуностимуляторной мРНК, который активирует сигналинг NFκB, кодирует конститутивно активный конструкт мРНК IKKα или конститутивно активный конструкт мРНК IKKβ. В одном варианте осуществления конститутивно активный полипептид IKKβ человека содержит мутации S177E и S181E, такой как последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 87. В одном варианте осуществления конститутивно активный полипептид IKKβ человека содержит мутации S177A и S181A, такой как последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 88. В другом варианте осуществления конструкт мРНК кодирует конститутивно активный полипептид IKKβ мыши. В одном варианте осуществления конститутивно активный полипептид IKKβ содержит мутации S177E и S181E, такой как последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 148. В одном варианте осуществления конститутивно активный полипептид IKKβ мыши содержит мутации S177A и S181A, такую как последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89. В другом варианте осуществления конструкт мРНК кодирует конститутивно активный полипептид IKKαчеловека или мыши, содержащий мутацию PEST, такой как имеющий последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 91-92 (человек) или 95-96 (мышь). В другом варианте осуществления конструкт мРНК кодирует конститутивно активный полипептид IKKβ человека или мыши, содержащий мутацию PEST, такой как имеющий последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 93-94 (человек) или 97-98 (мышь).

В другом варианте осуществления раскрытие обеспечивает конструкт мРНК, который активирует сигналинг NFκB, кодирующий

взаимодействующую с рецептором протеинкиназу 1 (RIPK1). Структура конструктов ДНК, кодирующих конструкты RIPK1, которые индуцируют иммуногенную клеточную гибель, описаны в данной области техники, например, в Yatim, N. et al. (2015) *Science* 350:328-334 или Orozco, S. et al. (2014) *Cell Death Differ.* 21:1511-1521, и могут быть использованы при разработке подходящих конструктов РНК, которые приведены в данном документе, также для активации сигналинга NFkB (см. Примеры). В одном варианте осуществления конструкт мРНК кодирует аминокислоты 1-555 RIPK1 полипептида RIPK1 человека или мыши, а также домен IZ, такого как имеющего последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 99 (человек) или 102 (мышь). В одном варианте осуществления конструкт мРНК кодирует аминокислоты 1-555 RIPK1 полипептида RIPK1 человека или мыши, а также домены EE и DM, такого как имеющего последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 100 (человек) или 103 (мышь). В одном варианте осуществления конструкт мРНК кодирует аминокислоты 1-555 RIPK1 полипептида RIPK1 человека или мыши, а также домены RR и DM, такого как имеющего последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 101 (человек) или 104 (мышь).

В еще одном варианте осуществления конструкт иммуностимуляторной мРНК, которая активирует сигналинг NFkB, кодирует полипептид Btk, такой как мутантный полипептид Btk, такой как полипептид Btk (E41K) (например, кодирующий аминокислотную последовательность OPC, приведенную в SEQ ID NO: 114)

В еще одном варианте осуществления конструкт иммуностимуляторной мРНК, которая активирует сигналинг NFkB, кодирует белок TAK-TAB1, такой как конститутивно активный TAK-TAB1. В одном варианте осуществления конструкт иммуностимуляторной мРНК кодирует белок TAK-TAB1 человека, такой как имеющий последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 105.

Дополнительные иммуностимуляторные мРНК

Данное раскрытие обеспечивает дополнительные конструкты иммуностимуляторных мРНК. Например, в одном варианте осуществления конструкт иммуностимуляторной мРНК кодирует белок с низкой pI, прямо связывающий IAP, (DIABLO) (также известный как SMAC/DIABLO). Как описано в приведенных в данном документе примерах, конструкты DIABLO индуцируют высвобождение цитокинов. В одном варианте осуществления раскрытие обеспечивает конструкт

мРНК, кодирующий последовательность изоформы 1 человеческого DIABLO дикого типа, такую как последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 106 (соответствует 239-аминокислотному предшественнику изоформы 1 DIABLO человека, раскрытому в данной области техники под номером доступа Genbank NP_063940.1). В другом варианте осуществления конструкт мРНК кодирует последовательность изоформы 1 DIABLO человека, содержащую мутацию S126L, такую как последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 107. В другом варианте осуществления конструкт мРНК кодирует аминокислоты 56-239 изоформы 1 DIABLO человека, такой как последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 108. В другом варианте осуществления конструкт мРНК кодирует аминокислоты 56-239 изоформы 1 DIABLO человека и содержит мутацию S126L, такой как имеющей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 109. В другом варианте осуществления конструкт мРНК кодирует последовательность изоформы 3 человеческого DIABLO дикого типа, такую как последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 110 (соответствует 195-аминокислотной изоформы 3 DIABLO человека, раскрытой в данной области техники под номером доступа Genbank NP_001265271.1). В другом варианте осуществления конструкт мРНК кодирует последовательность изоформы 3 DIABLO человека, содержащую мутацию S82L, такую как последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 110. В другом варианте осуществления конструкт мРНК кодирует аминокислоты 56-195 изоформы 3 DIABLO человека, такой как последовательность, приведенная в SEQ ID NO: 111. В другом варианте осуществления конструкт мРНК кодирует аминокислоты 56-195 изоформы 3 DIABLO человека и содержит мутацию S82L, такой как имеющей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 112.

В дополнительных вариантах осуществления конструкт иммуностимуляторной мРНК кодирует полипептид SOC3 (например, кодирующий аминокислотную последовательность OPC, приведенную в SEQ ID NO: 115) или кодирует полипептид самоактивирующейся каспазы-1 (например, кодирующий любую из аминокислотных последовательностей OPC, приведенных в SEQ ID NO: 116-119), который может способствовать расщеплению про-ИЛ-1β и про-ИЛ-18 до их соответствующих зрелых форм.

В еще одних других вариантах осуществления конструкт иммуностимуляторной мРНК кодирует белок, который модулирует активность дендритных клеток (ДК), такую как стимуляция

продукции, активности или мобилизации ДК. Неограничивающим примером белка, который стимулирует мобилизацию ДК, является FLT3. Соответственно, в одном варианте осуществления конструкт иммуностимуляторной мРНК кодирует белок FLT3.

Конструкт иммуностимуляторной мРНК обычно содержит, помимо полипептид-кодирующих последовательностей, структурные характеристики, как описано в данном документе для конструктов мРНК (например, модифицированные нуклеотидные основания, 5'-кэп, 5'-НТО, 3'-НТО, miR-связывающий сайт(ы), поли(А)-хвост, как описано в данном документе). Подходящие компоненты конструкта мРНК являются такими, как описано в данном документе.

**Композиции представляющих интерес раковых антигенов и иммуностимуляторов**

В другом аспекте раскрытие обеспечивает композицию, содержащую по меньшей мере одну матричную РНК (например, модифицированную мРНК (ммРНК)), кодирующую: (i) по меньшей мере один представляющий интерес антиген (пептид(ы) с активирующей онкогенной мутацией) и (ii) полипептид, который усиливает иммунный ответ против по меньшей мере одного представляющего интерес антигена (пептида(ов) с активирующей онкогенной мутацией), когда по меньшей мере одну мРНК вводят субъекту, при этом указанная мРНК содержит одно или более модифицированных нуклеотидных оснований. Таким образом, раскрытие обеспечивает композиции, содержащие иммуностимуляторную мРНК и мРНК, кодирующую представляющий интерес антиген (пептид(ы) с активирующей онкогенной мутацией), причем один конструкт мРНК может кодировать как представляющий интерес антиген(ы), так и полипептид, который усиливает иммунный ответ на антиген(ы); или, альтернативно, композицию, которая может содержать два или более отдельных конструкта мРНК, первую мРНК и вторую мРНК (или третью, или четвертую мРНК), при этом первая мРНК кодирует по меньшей мере один представляющий интерес антиген, а вторая мРНК кодирует полипептид, который усиливает иммунный ответ на антиген(ы) (т.е. вторая мРНК содержит иммуностимулятор).

В этих вариантах осуществления, включающих первую мРНК, кодирующую представляющий интерес антиген(ы), и вторую мРНК, кодирующую полипептид, который усиливает иммунный ответ на представляющий интерес антиген(ы), первую мРНК и вторую мРНК можно совместно комбинировать (например, перед совместным введением), например, совместно составлены в одной и той же

липидной наночастице.

В этих вариантах осуществления, включающих одну мРНК, кодирующую как представляющий интерес антиген(ы), так и полипептид, который усиливает иммунный ответ на представляющий интерес антиген(ы), последовательности, кодирующие полипептид, могут быть расположены в конструкте мРНК по ходу или против хода транскрипции от последовательностей, кодирующих представляющих интерес антиген. Например, неограничивающие примеры конструктов мРНК, кодирующих как антиген, так и иммуностимуляторный полипептид, включают такие, которые кодируют по меньшей мере один мутантный антиген KRAS и конститутивно активный полипептид STING, например, кодирующие аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 48–71. В одном варианте осуществления конститутивно активный полипептид STING расположен на N-терминальном конце конструкта (т. е. по ходу транскрипции от последовательностей, кодирующих антиген), как показано в SEQ ID NO: 48–57. В другом варианте осуществления конститутивно активный полипептид STING расположен на C-терминальном конце конструкта (т. е. против хода транскрипции от последовательностей, кодирующих антиген), как показано в SEQ ID NO: 58–71.

Различные мРНК, кодирующие представляющие интерес антигены (например, мРНК-вакцины), которые можно использовать в комбинации с иммуностимуляторной мРНК согласно раскрытию, описаны более подробно ниже.

**Компоненты конструкта мРНК**

мРНК может быть природной или не встречающейся в природе мРНК. мРНК может содержать одно или более модифицированных нуклеотидных оснований, нуклеозидов или нуклеотидов, как описано ниже, и в этом случае ее можно назвать «модифицированной мРНК» или «ммРНК». Как описано в данном документе «нуклеозид» определяется как соединение, содержащее молекулу сахара (например, пентозу или рибозу) или ее производное в комбинации с органическим основанием (например, пурином или пиримидином) или его производным (также упоминается в данном документе как «нуклеотидное основание»). Как описано в данном документе, «нуклеотид» определяется как нуклеозид, содержащий фосфатную группу.

мРНК может содержать 5'-нетранслируемую область (5'-НТО), 3'-нетранслируемую область (3'-НТО) и/или кодирующую область

(например, открытую рамку считывания). Иллюстративная 5'-НТО для применения в конструктах приведена в SEQ ID NO: 21. Иллюстративная 3'-НТО для применения в конструктах приведена в SEQ ID NO: 22. Иллюстративная 3'-НТО, содержащая сайты связывания miR-122 и miR-142.3p, для применения в конструктах показана в SEQ ID NO: 23. мРНК может содержать любое подходящее количество пар оснований, включая десятки (например, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100), сотни (например, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 или 900) или тысячи (например, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000) пар оснований. Любое количество (например, все, некоторые или ни одного) нуклеотидных оснований, нуклеозидов или нуклеотидов может быть аналогом канонических типов, замещенного, модифицированного или иного не встречающегося в природе. В определенных вариантах осуществления все конкретные типы нуклеотидных оснований могут быть модифицированы.

В некоторых вариантах осуществления мРНК, как описано в данном документе, может содержать структуру 5'-кэп, терминирующий нуклеотид, необязательно последовательность Козак (также известную как консенсусная последовательность Козак), «шпильку», поли(А)-последовательность и/или сигнал полиаденилирования.

Структура 5'-кэп или типы кэп-структур представляют собой соединение, содержащее две части нуклеозида, соединенные линкером, и могут быть выбраны из природной кэп-структуры, не встречающейся в природе кэп-структуры или аналога кэп-структуры или аналога кэп-структуры с правильной ориентацией (ARCA). Тип кэп-структуры может содержать один или более модифицированных нуклеозидов и/или линкерных фрагментов. Например, природная кэп-структура мРНК может содержать гуаниновый нуклеотид и гуаниновый нуклеотид (G), метилированный в положении 7, соединенные трифосфатной связью в их 5′ положениях, например, $m^7$G(5′)ppp(5′)G, обычно записывается как $m^7$GpppG. Тип кэп-структуры также может быть аналогом кэп-структуры с правильной ориентацией. Неограничивающий перечень возможных типов кэп-структур включает $m^7$GpppG, $m^7$Gpppm$^7$G, $m^7$3′dGpppG, $m_2^{7,03}$′GpppG, $m_2^{7,03}$′GppppG, $m_2^{7,02}$′GppppG, $m^7$Gpppm$^7$G, $m^7$3′dGpppG, $m_2^{7,03}$′GpppG, $m_2^{7,03}$′GppppG, и $m_2^{7,02}$′GppppG.

мРНК может вместо или дополнительно содержать терминирующий нуклеозид. Например, терминирующий нуклеозид может включать те

нуклеозиды, которые дезоксигенированы в 2′ и/или 3′ положениях их сахарной группы. Такие типы могут включать 3'дезоксиаденозин (кордицепин), 3'дезоксиуридин, 3'дезоксицитозин, 3'дезоксигуанозин, 3'дезокситимин, и 2',3'дидезоксинуклеозиды, такие как 2',3'дидезоксиаденозин, 2',3'дидезоксиуридин, 2',3'дидезоксицитозин, 2',3'дидезоксигуанозин, и 2',3'дидезокситимин. В некоторых вариантах осуществления включение терминирующего нуклеотида в мРНК, например при 3'-конце, может привести к стабилизации мРНК, как описано, например, в международной патентной публикации № WO 2013/103659.

мРНК может вместо или дополнительно содержать «шпильку», такую как гистоновую шпильку. «Шпилька» может содержать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более пар нуклеотидных оснований. Например, шпилька может содержать 4, 5, 6, 7 или 8 пар нуклеотидных оснований. Шпилька может быть расположена в любой области мРНК. Например, шпилька может быть расположена в, до или после нетранслируемой области (5'-нетранслируемой области или 3'-нетранслируемой области), кодирующей области или последовательности или поли(А)-хвоста. В некоторых вариантах осуществления шпилька может влиять на одну или более функций мРНК, таких как инициация трансляции, эффективность трансляции и/или терминация транскрипции.

мРНК может вместо или дополнительно содержать поли(А)-последовательность и/или сигнал полиаденилирования. Поли(А)-последовательность может состоять полностью или в основном из адениновых нуклеотидов или их аналогов или производных. Поли(А)-последовательность может представлять собой хвост, расположенный рядом с 3'-нетранслируемой областью мРНК. В некоторых вариантах осуществления поли(А)-последовательность может влиять на ядерный экспорт, трансляцию и/или стабильность мРНК.

мРНК может вместо или дополнительно содержать сайт связывания микроРНК.

В некоторых вариантах осуществления мРНК представляет собой бицистронную мРНК, содержащую первую кодирующую область и вторую кодирующую область с промежуточной последовательностью, содержащей последовательность участка внутренней посадки рибосомы (IRES), которая позволяет инициировать внутреннюю трансляцию между первой и второй кодирующими областями, или с промежуточной последовательностью, кодирующей саморасщепляющийся пептид, такой как пептид 2А. Последовательности IRES и пептиды

2A обычно используются для усиления экспрессии множества белков из одного и того же вектора. Множество последовательностей IRES известны и доступны в данной области техники и могут быть использованы, включая, например, IRES вируса энцефаломиокардита.

В одном варианте осуществления полинуклеотиды согласно данному раскрытию могут содержать последовательность, кодирующую саморасщепляющийся пептид. Саморасщепляющийся пептид может представлять собой, но не ограничиваясь этим, пептид 2A. Разнообразные пептиды 2A известны и доступны в данной области техники и могут быть использованы, включая, например, пептид 2A вируса ящура (FMDV), пептид 2A вируса ринита A, пептид 2A вируса ***Thosea asigna*** и пептид 2A тешовируса-1 свиней. Пептиды 2A используются несколькими вирусами для синтеза двух белков из одного транскрипта путем ухода с рибосомы, так что нормальная пептидная связь нарушается в пептидной последовательности 2A, в результате чего в одном трансляционном событии образуются два прерывистых белка. В качестве неограничивающего примера пептид 2A может иметь последовательность белка: GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO: 24), его фрагменты или варианты. В одном варианте осуществления пептид 2A расщепляется между последним глицином и последним пролином. В качестве другого неограничивающего примера полинуклеотиды согласно раскрытию могут содержать полинуклеотидную последовательность, кодирующую 2A пептид, имеющий фрагменты последовательности белка GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:24) или их варианты. Одним из примеров полинуклеотидной последовательности, кодирующей пептид 2A, является: GGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGAC CT (SEQ ID NO: 25). В одном иллюстративном варианте осуществления пептид 2A кодируется следующей последовательностью: 5'-TCCGGACTCAGATCCGGGGATCTCAAAATTGTCGCTCCTGTCAAACAAACTCTTAACTTTGATT TACTCAAACTGGCTGGGGATGTAGAAAGCAATCCAGGTCCACTC-3'(SEQ ID NO: 26). Полинуклеотидная последовательность пептида 2A может быть модифицирована или оптимизирована по кодонам способами, описанными в данном документе, и/или известными в данной области техники.

В одном варианте осуществления эта последовательность может использоваться для разделения кодирующих областей двух или более представляющих интерес полипептидов. В качестве

неограничивающего примера, последовательность, кодирующая пептид F2A, может находиться между первой кодирующей областью A и второй кодирующей областью B (A-F2Apep-B). Присутствие пептида F2A приводит к расщеплению одного длинного белка между глицином и пролином в конце пептидной последовательности F2A (NPGP расщепляется с образованием NPG и P), образуя тем самым отдельный белок A (с 21 аминокислотой присоединенного пептида F2A, заканчивающегося NPG) и отдельный белок B (с 1 аминокислотой P присоединенного пептида F2A). Аналогично, для других пептидов 2A (P2A, T2A и E2A) присутствие пептида в длинном белке приводит к расщеплению между глицином и пролином в конце последовательности пептида 2A (NPGP расщепляется с образованием NPG и P). Белок A и белок B могут представлять собой одинаковые или разные представляющие интерес пептиды или полипептиды. В конкретных вариантах осуществления белок A представляет собой полипептид, который вызывает иммуногенную клеточную гибель, а белок B представляет собой другой полипептид, который стимулирует воспалительный и/или иммунный ответ, и/или регулирует иммунологическую реактивность (как описано далее ниже).

**Модифицированные мРНК**

В некоторых вариантах осуществления мРНК согласно раскрытию содержит одно или более модифицированных нуклеотидных оснований, нуклеозидов или нуклеотидов (называемых "модифицированными мРНК" или "ммРНК"). В некоторых вариантах осуществления модифицированные мРНК могут иметь полезные свойства, включая повышенную стабильность, внутриклеточную задержку, улучшенную трансляцию и/или отсутствие значительной индукции врожденного иммунного ответа клетки, в которую вводится мРНК, по сравнению с эталонной немодифицированной мРНК. Следовательно, использование модифицированных мРНК может повышать эффективность продукции белка, внутриклеточное удержание нуклеиновых кислот, а также сохранять пониженную иммуногенность.

В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит одно или более (например, 1, 2, 3 или 4) различных модифицированных нуклеотидных оснований, нуклеозидов или нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит одно ли более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более) различных модифицированных нуклеотидных оснований, нуклеозидов или нуклеотидов. В некоторых вариантах

осуществления модифицированная мРНК может иметь пониженную деградацию в клетке, в которую введена мРНК, по сравнению с соответствующей немодифицированной мРНК.

В некоторых вариантах осуществления модифицированное нуклеотидное основание представляет собой модифицированный урацил. Иллюстративные нуклеотидные основания и нуклеозиды, имеющие модифицированный урацил, включают псевдоуридин (ψ), пиридин-4-один рибонуклеозид, 5-азауридин, 6-азауридин, 2-тио-5-азауридин, 2-тиоуридин ($s^2U$), 4-тиоуридин ($s^4U$), 4-тиопсевдоуридин, 2-тиопсевдоуридин, 5-гидроксиуридин ($ho^5U$), 5-аминоаллилуридин, 5-галоуридин (например, 5-иодуридин 5-бромуридин), 3-метилуридин ($m^3U$), 5-метоксиуридин ($mo^5U$), уридин-5-оксиуксусную кислоту ($cmo^5U$), метиловый эфир уридин-5-оксиуксусной кислоты ($mcmo^5U$), 5-карбоксиметилуридин ($cm^5U$), 1-карбоксиметилпсевдоуридин, 5-карбоксигидроксиметилуридин ($chm^5U$), метиловый эфир 5-карбоксигидроксиметилуридина ($mchm^5U$), 5-метоксикарбонилметилуридин ($mcm^5U$), 5-метоксикарбонилметил-2-тиоуридин ($mcm^5s^2U$), 5-аминометил-2-тиоуридин ($nm^5s^2U$), 5-метиламинометилуридин ($mnm^5U$), 5-метиламинометил-2-тиоуридин ($mnm^5s^2U$), 5-метиламинометил-2-селеноуридин ($mnm^5se^2U$), 5-карбамоилметилуридин ($ncm^5U$), 5-карбоксиметиламинометилуридин ($cmnm^5U$), 5-карбоксиметиламинометил-2-тиоуридин ($cmnm^5s^2U$), 5-пропинилуридин, 1-пропинилпсевдоуридин, 5-тауринометилуридин ($\tau m^5U$), 1-тауринометилпсевдоуридин, 5-тауринометил-2-тиоуридин ($\tau m^5s^2U$), 1-тауринометил-4-тиопсевдоуридин, 5-метилуридин ($m^5U$, т.е. имеющий основание нуклеиновой кислоты дезокситимин), 1-метилпсевдоуридин ($m^1\psi$), 5-метил-2-тиоуридин ($m^5s^2U$), 1-метил-4-тиопсевдоуридин ($m^1s^4\psi$), 4-тио-1-метилпсевдоуридин, 3-метилпсевдоуридин ($m^3\psi$), 2-тио-1-метилпсевдоуридин, 1-метил-1-дезазапсевдоуридин, 2-тио-1-метил-1-дезазапсевдоуридин, дигидроуридин (D), дигидропсевдоуридин, 5,6-дигидроуридин, 5-метилдигидроуридин ($m^5D$), 2-тиодигидроуридин, 2-тиодигидропсевдоуридин, 2-метоксиуридин, 2-метокси-4-тиоуридин, 4-метоксипсевдоуридин, 4-метокси-2-тиопсевдоуридин, N1-метилпсевдоуридин, 3-(3-амино-3-карбоксипропил)уридин ($acp^3U$), 1-метил-3-(3-амино-3-карбоксипропил)псевдоуридин ($acp^3\psi$), 5-(изопентениламинометил)уридин ($inm^5U$), 5-(изопентениламинометил)-2-тиоуридин ($inm^5s^2U$),α-тиоуридин, 2'-O-метилуридин (Um), 5,2'-O-диметилуридин ($m^5Um$), 2'-O-метилпсевдоуридин ($\psi m$), 2-тио-2'-O-метилуридин ($s^2Um$), 5-метоксикарбонилметил-2'-O-метилуридин

(mcm$^5$Um), 5-карбамоилметил-2'-O-метилуридин (ncm$^5$Um), 5-карбоксиметиламинометил-2'-O-метилуридин (cmnm$^5$Um), 3,2'-O-диметилуридин (m$^3$Um),и 5-(изопентениламинометил)-2'-O-метилуридин (inm$^5$Um), 1-тиоуридин, дезокситимидин, 2'-F-арауридин, 2'-F-уридин, 2'-OH-арауридин, 5-(2-карбометоксивинил)уридин и 5-[3-(1-E-пропениламино)уридин].

В некоторых вариантах осуществления модифицированное нуклеотидное основание представляет собой модифицированный цитозин. Иллюстративные нуклеотидные основания и нуклеозиды, имеющие модифицированный цитозин, включают 5-азацитидин, 6-азацитидин, псевдоизоцитидин, 3-метилцитидин (m$^3$C), N4-ацетилцитидин (ac$^4$C), 5-формилцитидин (f$^5$C), N4-метилцитидин (m$^4$C), 5-метилцитидин (m$^5$C), 5-галогенцитидин (например, 5-иодцитидин), 5-гидроксиметилцитидин (hm$^5$C), 1-метилпсевдоизоцитидин, пирролоцитидин, пирролопсевдоизоцитидин, 2-тиоцитидин (s$^2$C), 2-тио-5-метилцитидин, 4-тиопсевдоизоцитидин, 4-тио-1-метилпсевдоизоцитидин, 4-тио-1-метил-1-дезазапсевдоизоцитидин, 1-метил-1-дезазапсевдоизоцитидин, зебуларин, 5-азазебуларин, 5-метилзебуларин, 5-аза-2-тиозебуларин, 2-тиозебуларин, 2-метоксицитидин, 2-метокси-5-метилцитидин, 4-метоксипсевдоизоцитидин, 4-метокси-1-метилпсевдоизоцитидин, лизидин (k$_2$C), α-тиоцитидин, 2'-O-метилцитидин (Cm), 5,2'-O-диметилцитидин (m$^5$Cm), N4-ацетил-2'-O-метилцитидин (ac$^4$Cm), N4,2'-O-диметилцитидин (m$^4$Cm), 5-формил-2'-O-метилцитидин (f$^5$Cm), N4,N4,2'-O-триметилцитидин (m$^4_2$Cm), 1-тиоцитидин, 2'-F-арацитидин, 2'-F-цитидин и 2'-OH-арацитидин.

В некоторых вариантах осуществления модифицированное нуклеотидное основание представляет собой модифицированный аденин. Иллюстративные нуклеотидные основания и нуклеозиды, имеющие модифицированный аденин, включают α-тиоаденозин, 2-аминопурин, 2,6-диаминопурин, 2-амино-6-галогенпурин (например, 2-амино-6-хлорпурин), 6-галогенпурин (например, 6-хлорпурин), 2-амино-6-метилпурин, 8-азидоаденозин, 7-дезазааденин, 7-дезаза-8-азааденин, 7-дезаза-2-аминопурин, 7-дезаза-8-аза-2-аминопурин, 7-дезаза-2,6-диаминопурин, 7-дезаза-8-аза-2,6-диаминопурин, 1-метиладенозин (m$^1$A), 2-метиладенин (m$^2$A), N6-метиладенозин (m$^6$A), 2-метилтио-N6-метиладенозин (ms$^2$m$^6$A), N6-изопентениладенозин (i$^6$A), 2-метилтио-N6-изопентениладенозин (ms$^2$i$^6$A), N6-цис-гидроксиизопентенил)аденозин (io$^6$A), 2-метилтио-N6-(цис-гидроксиизопентенил)аденозин (ms$^2$io$^6$A), N6-

глицинилкарбамоиладенозин ($g^6A$), N6-треонилкарбамоиладенозин ($t^6A$), N6-метил-N6-треонилкарбамоиладенозин ($m^6t^6A$), 2-метилтио-N6-треонилкарбамоиладенозин ($ms^2g^6A$), N6,N6-диметиладенозин ($m^6{}_2A$), N6-гидроксинорвалилкарбамоиладенозин ($hn^6A$), 2-метилтио-N6-гидроксинорвалилкарбамоиладенозин ($ms^2hn^6A$), N6-ацетиладенозин ($ac^6A$), 7-метиладенин, 2-метилтиоаденин, 2-метоксиаденин, α-тиоаденозин, 2'-O-метиладенозин (Am), N6,2'-O-диметиладенозин ($m^6Am$), N6,N6,2'-O-триметиладенозин ($m^6{}_2Am$), 1,2'-O-диметиладенозин ($m^1Am$), 2'-O-рибозиладенозин (фосфат) (Ar(p)), 2-амино-N6-метилпурин, 1-тиоаденозин, 8-азидоаденозин, 2'-F-арааденозин, 2'-F-аденозин, 2'-OH-арааденозин и N6-(19-аминопентаоксанонадецил)-аденозин.

В некоторых вариантах осуществления модифицированное нуклеотидное основание представляет собой модифицированный гуанин. Иллюстративные нуклеотидные основания и нуклеозиды, имеющие модифицированный гуанин, включают α-тиогуанозин, инозин (I), 1-метилинозин ($m^1I$), виозин (imG), метилвиозин (mimG), 4-деметилвиозин (imG-14), изовиозин (imG2), вибутозин (yW), пероксивибутозин ($o_2yW$), гидроксивибутозин (OhyW), недостаточно модифицированный гидроксивибутозин (OhyW*), 7-дезазагуанозин, квеуозин (Q), эпоксиквеуозин (oQ), галактозилквеуозин (galQ), маннозилквеуозин (manQ), 7-циано-7-дезазагуанозин ($preQ_0$), 7-аминометил-7-дезазагуанозин ($preQ_1$), археозин ($G^+$), 7-дезаза-8-азагуанозин, 6-тиогуанозин, 6-тио-7-дезазагуанозин, 6-тио-7-дезаза-8-азагуанозин, 7-метилгуанозин ($m^7G$), 6-тио-7-метилгуанозин, 7-метилинозин, 6-метоксигуанозин, 1-метилгуанозин ($m^1G$), N2-метилгуанозин ($m^2G$), N2,N2-диметилгуанозин ($m^2{}_2G$), N2,7-диметилгуанозин ($m^{2,7}G$), N2,N2,7-диметилгуанозин ($m^{2,2,7}G$), 8-оксогуанозин, 7-метил-8-оксо-гуанозин, 1-метил-6-тиогуанозин, N2-метил-6-тиогуанозин, N2,N2-диметил-6-тиогуанозин, α-тиогуанозин, 2'-O-метилгуанозин (Gm), N2-метил-2'-O-метилгуанозин ($m^2Gm$), N2,N2-диметил-2'-O-метилгуанозин ($m^2{}_2Gm$), 1-метил-2'-O-метилгуанозин ($m^1Gm$), N2,7-диметил-2'-O-метилгуанозин ($m^{2,7}Gm$), 2'-O-метилинозин (Im), 1,2'-O-диметилинозин ($m^1Im$), 2'-O-рибозилгуанозин (фосфат) (Gr(p)), 1-тиогуанозин, O6-метилгуанозин, 2'-F-арагуанозин и 2'-F-гуанозин.

В некоторых вариантах осуществления мРНК согласно раскрытию содержит комбинацию одного или более из вышеупомянутых модифицированных нуклеотидных оснований (например, комбинацию из 2, 3 или 4 вышеупомянутых модифицированных нуклеотидных

оснований).

В некоторых вариантах осуществления модифицированное нуклеотидное основание представляет собой псевдоуридин (ψ), N1-метилпсевдоуридин ($m^1\psi$), 2-тиоуридин, 4'-тиоуридин, 5-метилцитозин, 2-тио-1-метил-1-дезазапсевдоуридин, 2-тио- 1-метилпсевдоуридин, 2-тио-5-азауридин, 2-тиодигидропсевдоуридин, 2-тиодигидроуридин, 2-тиопсевдоуридин, 4-метокси-2-тиопсевдоуридин, 4-метоксипсевдоуридин, 4-тио-1-метилпсевдоуридин, 4-тиопсевдоуридин, 5-азауридин, дигидропсевдоуридин, 5-метоксиуридин или 2'-О-метилуридин. В некоторых вариантах осуществления мРНК согласно раскрытию содержит комбинацию одного или более из вышеупомянутых модифицированных нуклеотидных оснований (например, комбинацию из 2, 3 или 4 вышеупомянутых модифицированных нуклеотидных оснований). В некоторых вариантах осуществления модифицированное нуклеотидное основание представляет собой N1-метилпсевдоуридин ($m^1\psi$), и мРНК согласно раскрытию полностью модифицирована N1-метилпсевдоуридином ($m^1\psi$). В некоторых вариантах осуществления N1-метилпсевдоуридин ($m^1\psi$) представляет 75-100% урацилов в мРНК. В некоторых вариантах осуществления N1-метилпсевдоуридин ($m^1\psi$) представляет 100% урацилов в мРНК.

В некоторых вариантах осуществления модифицированное нуклеотидное основание представляет собой модифицированный цитозин. Иллюстративные нуклеотидные основания и нуклеозиды, имеющие модифицированный цитозин, включают N4-ацетилцитидин ($ac^4C$), 5-метилцитидин ($m^5C$), 5-галогенцитидин (например, 5-иодцитидин), 5-гидроксиметилцитидин ($hm^5C$), 1-метил-псевдоизоцитидин, 2-тиоцитидин ($s^2C$), 2-тио-5-метилцитидин. В некоторых вариантах осуществления мРНК согласно раскрытию содержит комбинацию одного или более из вышеупомянутых модифицированных нуклеотидных оснований (например, комбинацию из 2, 3 или 4 вышеупомянутых модифицированных нуклеотидных оснований).

В некоторых вариантах осуществления модифицированное нуклеотидное основание представляет собой модифицированный аденин. Иллюстративные нуклеотидные основания и нуклеозиды, имеющие модифицированный аденин, включают 7-дезазааденин, 1-метиладенозин ($m^1A$), 2-метиладенин ($m^2A$), N6-метиладенозин ($m^6A$). В некоторых вариантах осуществления мРНК согласно раскрытию содержит комбинацию одного или более из вышеупомянутых

модифицированных нуклеотидных оснований (например, комбинацию из 2, 3 или 4 вышеупомянутых модифицированных нуклеотидных оснований).

В некоторых вариантах осуществления модифицированное нуклеотидное основание представляет собой модифицированный гуанин. Иллюстративные нуклеотидные основания и нуклеозиды, имеющие модифицированный гуанин, включают инозин (I), 1-метилинозин ($m^1I$), виозин (imG), метилвиозин (mimG), 7-дезазагуанозин, 7-циано-7-дезазагуанозин ($preQ_0$), 7-аминометил-7-дезазагуанозин ($preQ_1$), 7-метилгуанозин ($m^7G$), 1-метилгуанозин ($m^1G$), 8-оксогуанозин, 7-метил-8-оксогуанозин. В некоторых вариантах осуществления мРНК согласно раскрытию содержит комбинацию одного или более из вышеупомянутых модифицированных нуклеотидных оснований (например, комбинацию из 2, 3 или 4 вышеупомянутых модифицированных нуклеотидных оснований).

В некоторых вариантах осуществления модифицированное основание представляет собой 1-метилпсевдоуридин ($m^1\psi$), 5-метоксиуридин ($mo^5U$), 5-метилцитидин ($m^5C$), псевдоуридин ($\psi$), α-тиогуанозин или α-тиоаденозин. В некоторых вариантах осуществления мРНК согласно раскрытию содержит комбинацию одного или более из вышеупомянутых модифицированных нуклеотидных оснований (например, комбинацию из 2, 3 или 4 вышеупомянутых модифицированных нуклеотидных оснований).

В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит псевдоуридин ($\psi$). В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит псевдоуридин ($\psi$) и 5-метилцитидин ($m^5C$). В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит 1-метилпсевдоуридин ($m^1\psi$). В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит 1-метилпсевдоуридин ($m^1\psi$) и 5-метилцитидин ($m^5C$). В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит 2-тиоуридин ($s^2U$). В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит 2-тиоуридин и 5-метилцитидин ($m^5C$). В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит 5-метоксиуридин ($mo^5U$). В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит 5-метоксиуридин ($mo^5U$) и 5-метилцитидин ($m^5C$). В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит 2'-O-метилуридин. В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит 2'-O-метилуридин и 5-метилцитидин ($m^5C$). В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит N6-метиладенозин ($m^6A$). В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит N6-метиладенозин ($m^6A$) и 5-метилцитидин ($m^5C$).

В определенных вариантах осуществления мРНК согласно раскрытию является равномерно модифицированной (то есть полностью модифицированной, модифицированной по всей последовательности) для конкретной модификации. Например, мРНК может быть равномерно модифицирована с помощью N1-метилпсевдоуридина ($m^1\psi$) или 5-метилцитидина ($m^5C$), что означает, что все уридины или все цитозиновые нуклеозиды в последовательности мРНК заменяются на N1-метилпсевдоуридин ($m^1\psi$) или 5-метилцитидин ($m^5C$). Подобным образом, мРНК согласно раскрытию может быть равномерно модифицирована для любого типа нуклеозидного остатка, присутствующего в последовательности, путем замены модифицированным остатком, таким как указанные выше.

В некоторых вариантах осуществления мРНК согласно раскрытию может быть модифицирована в кодирующей области (например, в открытой рамке считывания, кодирующей полипептид). В других вариантах осуществления мРНК может быть модифицирована в областях помимо кодирующей области. Например, в некоторых вариантах осуществления предложены 5'-НТО и/или 3'-НТО, причем одна или обе могут независимо содержать одну или более различных модификаций нуклеозидов. В таких вариантах осуществления модификации нуклеозидов также могут присутствовать в кодирующей области.

Примеры модификаций нуклеозидов и их комбинаций, которые могут присутствовать в ммРНК согласно данному раскрытию, включают, но не ограничиваются ими, описанные в публикациях заявок на патенты PCT: WO2012045075, WO2014081507, WO2014093924, WO2014164253, и WO2014159813.

ммРНК согласно раскрытию может содержать комбинацию модификаций сахара, нуклеотидного основания и/или межнуклеозидной связи. Эти комбинации могут содержать любую одну или более модификаций, описанных в данном документе.

Примеры модифицированных нуклеозидов и комбинаций модифицированных нуклеозидов представлены ниже в Таблице 1 и Таблице 2. Данные комбинации модифицированных нуклеотидов могут быть использованы для образования ммРНК согласно раскрытию. В определенных вариантах осуществления модифицированные нуклеозиды могут быть частично или полностью замещены природными нуклеотидами мРНК согласно раскрытию. В качестве неограничивающего примера природный уридиновый нуклеотид может

быть замещен модифицированным нуклеозидом, описанным в данном документе. В другом неограничивающем примере природный нуклеозид уридин может быть частично замещен (например, около 0,1%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99,9% природных уридинов) по меньшей мере одним модифицированным нуклеозидом, раскрытым в данном документе.

**Таблица 1. Комбинации модификаций нуклеозидов**

| **Модифицированный нуклеотид** | **Комбинация модифицированных нуклеотидов** |
|---|---|
| α-тиоцитидин | α-тиоцитидин/5-иодуридин |
| | α-тиоцитидин/N1-метилпсевдоуридин |
| | α-тиоцитидин/α-тиоуридин |
| | α-тиоцитидин/5-метилуридин |
| | α-тиоцитидин/псевдоуридин |
| | около 50% цитозинов представляют собой α-тио-цитидин |
| псевдоизоцитидин | псевдоизоцитидин/5-иодуридин |
| | псевдоизоцитидин/N1-метилпсевдоуридин |
| | псевдоизоцитидин/α-тиоуридин |
| | псевдоизоцитидин/5-метилуридин |
| | псевдоизоцитидин/псевдоуридин |
| | около 25% цитозинов представляют собой псевдоизоцитидин |
| | псевдоизоцитидин/около 50% уридинов представляют собой N1-метил-псевдоуридин и около 50% уридинов представляют собой псевдоуридин |
| | псевдоизоцитидин/около 25% уридинов представляют собой N1-метилпсевдоуридин и около 25% уридинов представляют собой псевдоуридин |
| пирролоцитидин | пирролоцитидин/5-иодуридин |
| | пирролоцитидин/N1-метилпсевдоуридин |
| | пирролоцитидин/α-тиоуридин |
| | пирролоцитидин/5-метилуридин |

| | |
|---|---|
| | пирролоцитидин/псевдоуридин |
| | около 50% цитозинов представляют собой пирролоцитидин |
| 5-метилцитидин | 5-метилцитидин/5-иодуридин |
| | 5-метилцитидин/N1-метилпсевдоуридин |
| | 5-метилцитидин/α-тиоуридин |
| | 5-метилцитидин/5-метилуридин |
| | 5-метилцитидин/псевдоуридин |
| | около 25% цитозинов представляют собой 5-метилцитидин |
| | около 50% цитозинов представляют собой 5-метилцитидин |
| | 5-метилцитидин/5-метоксиуридин |
| | 5-метилцитидин/5-бромуридин |
| | 5-метилцитидин/2-тиоуридин |
| | 5-метилцитидин/около 50% уридинов представляют собой 2-тиоуридин |
| | около 50% уридинов представляют собой 5-метилцитидин/около 50% уридинов представляют собой 2-тиоуридин |
| N4-ацетилцитидин | N4-ацетилцитидин/5-иодуридин |
| | N4-ацетилцитидин/N1-метилпсевдоуридин |
| | N4-ацетилцитидин/α-тиоуридин |
| | N4-ацетилцитидин/5-метилуридин |
| | N4-ацетилцитидин/псевдоуридин |
| | около 50% цитозинов представляют собой N4-ацетилцитидин |
| | около 25% цитозинов представляют собой N4-ацетилцитидин |
| | N4-ацетилцитидин/5-метоксиуридин |
| | N4-ацетилцитидин/5-бромуридин |
| | N4-ацетилцитидин/2-тиоуридин |
| | около 50% цитозинов представляют собой N4-ацетилцитидин/около 50% уридинов представляют собой 2-тиоуридин |

**Таблица 2. Модифицированные нуклеозиды и их комбинации**

| |
|---|
| 1-(2,2,2-трифторэтил)псевдо-УТФ |
| 1-этилпсевдо-УТФ |
| 1-метилпсевдо-У-альфа-тио-ТФ |
| 1-метилпсевдоуридин ТФ, АТФ, ГТФ, ЦТФ |
| 1-метилпсевдо-УТФ/5-метил-ЦТФ/АТФ/ГТФ |
| 1-метилпсевдо-УТФ/ЦТФ/АТФ/ГТФ |
| 1-пропилпсевдо-УТФ |
| 25% 5-аминоаллил-ЦТФ+ 75% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 25% 5-аминоаллил-ЦТФ+ 75% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 25% 5-бром-ЦТФ+ 75% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 25% 5-бром-ЦТФ+ 75% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 25% 5-бром-ЦТФ+75% ЦТФ/1-метилпсевдо-УТФ |
| 25% 5-карбокси-ЦТФ+ 75% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 25% 5-карбокси-ЦТФ+ 75% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 25% 5-этил-ЦТФ+ 75% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 25% 5-этил-ЦТФ+ 75% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 25% 5-этинил-ЦТФ+ 75% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 25% 5-этинил-ЦТФ+ 75% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 25% 5-фтор-ЦТФ+ 75% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 25% 5-фтор-ЦТФ+ 75% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 25% 5-формил-ЦТФ+ 75% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 25% 5-формил-ЦТФ+ 75% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 25% 5-гидроксиметил-ЦТФ+ 75% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 25% 5-гидроксиметил-ЦТФ+ 75% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 25% 5-иод-ЦТФ+ 75% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 25% 5-иод-ЦТФ+ 75% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 25% 5-метокси-ЦТФ+ 75% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 25% 5-метокси-ЦТФ+75% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 25% 5-метил-ЦТФ+75% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% 1-метилпсевдо-УТФ |
| 25% 5-метил-ЦТФ+ 75% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 25% 5-метил-ЦТФ+75% ЦТФ/50% 5-метокси-УТФ+50% 1-метилпсевдо-УТФ |
| 25% 5-метил-ЦТФ+ 75% ЦТФ/50% 5-метокси-УТФ+50% УТФ |
| 25% 5-метил-ЦТФ+75% ЦТФ/5-метокси-УТФ |

| |
|---|
| 25% 5-метил-ЦТФ+75% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% 1-метилпсевдо-УТФ |
| 25% 5-метил-ЦТФ+ 75% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 25% 5-фенил-ЦТФ+ 75% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 25% 5-фенил-ЦТФ+ 75% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 25% 5-трифторметил-ЦТФ+ 75% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 25% 5-трифторметил-ЦТФ+ 75% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 25% 5-трифторметил-ЦТФ+75% ЦТФ/1-метилпсевдо-УТФ |
| 25% N4-Ac-ЦТФ+ 75% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 25% N4-Ac-ЦТФ+ 75% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 25% N4-Bz-ЦТФ+ 75% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 25% N4-Bz-ЦТФ+ 75% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 25% N4-метил-ЦТФ+ 75% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 25% N4-метил-ЦТФ+ 75% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 25% псевдоизо-ЦТФ+ 75% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 25% псевдоизо-ЦТФ+ 75% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 25% 5-бром-ЦТФ/75% ЦТФ/псевдо-УТФ |
| 25% 5-метокси-УТФ/25% 5-метил-ЦТФ/АТФ/ГТФ |
| 25% 5-метокси-УТФ/5-метил-ЦТФ/АТФ/ГТФ |
| 25% 5-метокси-УТФ/75% 5-метил-ЦТФ /АТФ/ГТФ |
| 25% 5-метокси-УТФ/ЦТФ/АТФ/ГТФ |
| 25% 5-метокси-УТФ/50% 5-метил-ЦТФ /АТФ/ГТФ |
| 2-амино-АТФ |
| 2-тио-ЦТФ |
| 2-тиопсевдоуридин ТФ, АТФ, ГТФ, ЦТФ |
| 2-тиопсевдо-УТФ |
| 2-тио-УТФ |
| 3-метил-ЦТФ |
| 3-метилпсевдо-УТФ |
| 4-тио-УТФ |
| 50% 5-бром-ЦТФ+50% ЦТФ/1-метилпсевдо-УТФ |
| 50% 5-гидроксиметил-ЦТФ+50% ЦТФ/1-метилпсевдо-УТФ |
| 50% 5-метокси-УТФ/5-метил-ЦТФ/АТФ/ГТФ |
| 50% 5-метил-ЦТФ+50% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% 1-метилпсевдо-УТФ |
| 50% 5-метил-ЦТФ+ 50% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |

| |
|---|
| 50% 5-метил-ЦТФ+50% ЦТФ/50% 5-метокси-УТФ+50% 1-метилпсевдо-УТФ |
| 50% 5-метил-ЦТФ+50% ЦТФ/50% 5-метокси-УТФ+50% УТФ |
| 50% 5-метил-ЦТФ+50% ЦТФ/5-метокси-УТФ |
| 50% 5-метил-ЦТФ+50% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% 1-метилпсевдо-УТФ |
| 50% 5-метил-ЦТФ+ 50% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 50% 5-трифторметил-ЦТФ+50% ЦТФ/1-метилпсевдо-УТФ |
| 50% 5-бром-ЦТФ/50% ЦТФ/псевдо-УТФ |
| 50% 5-метокси-УТФ/25% 5-метил-ЦТФ /АТФ/ГТФ |
| 50% 5-метокси-УТФ/50% 5-метил-ЦТФ /АТФ/ГТФ |
| 50% 5-метокси-УТФ/75% 5-метил-ЦТФ /АТФ/ГТФ |
| 50% 5-метокси-УТФ/ЦТФ/АТФ/ГТФ |
| 5-аминоаллил-ЦТФ |
| 5-аминоаллил-ЦТФ/ 5-метокси-УТФ |
| 5-аминоаллил-УТФ |
| 5-бром-ЦТФ |
| 5-бром-ЦТФ/5-метокси-УТФ |
| 5-бром-ЦТФ/1-метилпсевдо-УТФ |
| 5-бром-ЦТФ/псевдо-УТФ |
| 5-бромцитидин ТФ, АТФ, ГТФ, УТФ |
| 5-бром-УТФ |
| 5-карбокси-ЦТФ/5-метокси-УТФ |
| 5-этил-ЦТФ/5-метокси-УТФ |
| 5-этинил-ЦТФ/5-метокси-УТФ |
| 5-фтор-ЦТФ/5-метокси-УТФ |
| 5-формил-ЦТФ/5-метокси-УТФ |
| 5-гидроксиметил-ЦТФ/5-метокси-УТФ |
| 5-гидроксиметил-ЦТФ |
| 5-гидроксиметил-ЦТФ/1-метилпсевдо-УТФ |
| 5-гидроксиметил-ЦТФ/5-метокси-УТФ |
| 5-гидроксиметилцитидин ТФ, АТФ, ГТФ, УТФ |
| 5-иод-ЦТФ/5-метокси-УТФ |
| 5-Ме-ЦТФ/5-метокси-УТФ |
| 5-метоксикарбонил метил-УТФ |
| 5-метокси-ЦТФ/5-метокси-УТФ |

| |
|---|
| 5-метоксиуридин ТФ, АТФ, ГТФ, УТФ |
| 5-метокси-УТФ |
| 5-метокси-УТФ |
| 5-метокси-УТФ/N6-изопентенил-АТФ |
| 5-метокси-УТФ/25% 5-метил-ЦТФ/АТФ/ГТФ |
| 5-метокси-УТФ/5-метил-ЦТФ/АТФ/ГТФ |
| 5-метокси-УТФ/75% 5-метил-ЦТФ/АТФ/ГТФ |
| 5-метокси-УТФ/ЦТФ/АТФ/ГТФ |
| 5-метил-2-тио-УТФ |
| 5-метиламинометил-УТФ |
| 5-метил-ЦТФ/5-метокси-УТФ |
| 5-метил-ЦТФ/5-метокси-УТФ (кэп 0) |
| 5-метил-ЦТФ/5-метокси-УТФ (без кэпа) |
| 5-метил-ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% 1-метилпсевдо-УТФ |
| 5-метил-ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 5-метил-ЦТФ/50% 5-метокси-УТФ+50% 1-метилпсевдо-УТФ |
| 5-метил-ЦТФ/50% 5-метокси-УТФ+50% УТФ |
| 5-метил-CTP/5-метокси-УТФ/N6-Me-АТФ |
| 5-метил-ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% 1-метилпсевдо-УТФ |
| 5-метил-ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 5-фенил-ЦТФ/5-метокси-УТФ |
| 5-трифторметил-ЦТФ/5-метокси-УТФ |
| 5-трифторметил-ЦТФ |
| 5-трифторметил-ЦТФ/5-метокси-УТФ |
| 5-трифторметил-ЦТФ/1-метилпсевдо-УТФ |
| 5-трифторметил-ЦТФ/псевдо-УТФ |
| 5-трифторметил-УТФ |
| 5-трифторметилцитидин ТФ, АТФ, ГТФ, УТФ |
| 75% 5-аминоаллил-ЦТФ+ 25% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 75% 5-аминоаллил-ЦТФ+ 25% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 75% 5-бром-ЦТФ+ 25% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 75% 5-бром-ЦТФ+ 25% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 75% 5-карбокси-ЦТФ+ 25% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 75% 5-карбокси-ЦТФ+ 25% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |

| |
|---|
| 75% 5-этил-ЦТФ+ 25% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 75% 5-этил-ЦТФ+ 25% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 75% 5-этинил-ЦТФ+ 25% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 75% 5-этинил-ЦТФ+ 25% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 75% 5-фтор-ЦТФ+ 25% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 75% 5-фтор-ЦТФ+ 25% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 75% 5-формил-ЦТФ+ 25% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 75% 5-формил-ЦТФ+ 25% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 75% 5-гидроксиметил-ЦТФ+ 25% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 75% 5-гидроксиметил-ЦТФ+ 25% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 75% 5-иод-ЦТФ+ 25% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 75% 5-иод-ЦТФ+ 25% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 75% 5-метокси-ЦТФ+25% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 75% 5-метокси-ЦТФ+25% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 75% 5-метокси-УТФ/5-метил-ЦТФ/АТФ/ГТФ |
| 75% 5-метил-ЦТФ+25% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% 1-метилпсевдо-УТФ |
| 75% 5-метил-ЦТФ+ 25% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 75% 5-метил-ЦТФ+25% ЦТФ/50% 5-метокси-УТФ+50% 1-метилпсевдо-УТФ |
| 75% 5-метил-ЦТФ+ 25% ЦТФ/50% 5-метокси-УТФ+50% УТФ |
| 75% 5-метил-ЦТФ+25% ЦТФ/5-метокси-УТФ |
| 75% 5-метил-ЦТФ+25% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% 1-метилпсевдо-УТФ |
| 75% 5-метил-ЦТФ+ 25% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 75% 5-фенил-ЦТФ+ 25% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 75% 5-фенил-ЦТФ+ 25% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 75% 5-трифторметил-ЦТФ+ 25% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 75% 5-трифторметил-ЦТФ+ 25% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 75% 5-трифторметил-ЦТФ+25% ЦТФ/1-метилпсевдо-УТФ |
| 75% N4-Ac-ЦТФ+ 25% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 75% N4-Ac-ЦТФ+ 25% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 75% N4-Bz-ЦТФ+ 25% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 75% N4-Bz-ЦТФ+ 25% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 75% N4-метил-ЦТФ+ 25% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |
| 75% N4-метил-ЦТФ+ 25% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 75% псевдоизо-ЦТФ+ 25% ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ |

| |
|---|
| 75% псевдоизо-ЦТФ+ 25% ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% УТФ |
| 75% 5-бром-ЦТФ/25% ЦТФ/1-метилпсевдо-УТФ |
| 75% 5-бром-ЦТФ/25% ЦТФ/псевдо-УТФ |
| 75% 5-метокси-УТФ/25% 5-метил-ЦТФ /АТФ/ГТФ |
| 75% 5-метокси-УТФ/50% 5-метил-ЦТФ /АТФ/ГТФ |
| 75% 5-метокси-УТФ/75% 5-метил-ЦТФ /АТФ/ГТФ |
| 75% 5-метокси-УТФ/ЦТФ/АТФ/ГТФ |
| 8-аза-АТФ |
| Альфа-тио-ЦТФ |
| ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+75% 1-метилпсевдо-УТФ |
| ЦТФ/25% 5-метокси-УТФ+ 75% УТФ |
| ЦТФ/50% 5-метокси-УТФ+50% 1-метилпсевдо-УТФ |
| ЦТФ/50% 5-метокси-УТФ+ 50% УТФ |
| ЦТФ/5-Метокси-УТФ |
| ЦТФ/5-метокси-УТФ (кэп 0) |
| ЦТФ/5-метокси-УТФ (без кэпа) |
| ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+25% 1-метилпсевдо-УТФ |
| ЦТФ/75% 5-метокси-УТФ+ 25% УТФ |
| ЦТФ/УТФ (без кэпа) |
| N1-Me-ГТФ |
| N4-Ac-ЦТФ |
| N4Ac-ЦТФ/1-метилпсевдо-УТФ |
| N4Ac-ЦТФ/5-метокси-УТФ |
| N4-ацетилцитидин ТФ, АТФ, ГТФ, УТФ |
| N4-Bz-ЦТФ/5-метокси-УТФ |
| N4-метил ЦТФ |
| N4-метил-ЦТФ/5-метокси-УТФ |
| Псевдоизо-ЦТФ/5-метокси-УТФ |
| псевдо-У-альфа-тио-ТФ |
| псевдоуридин ТФ, АТФ, ГТФ, ЦТФ |
| псевдо-УТФ/5-метил-ЦТФ/АТФ/ГТФ |
| метиловый эфир УТФ-5-оксиуксусной кислоты |
| Ксантозин |

В соответствии с раскрытием полинуклеотиды согласно раскрытию могут быть синтезированы, чтобы содержать комбинации

или отдельные модификации из Таблицы 1 или Таблицы 2.

Если указана одна модификация, указанный нуклеозид или нуклеотид представляет 100 процентов того нуклеотида или нуклеозида, A, U, G или C, который был модифицирован. Там, где указаны проценты, они представляют собой процентное содержание данного конкретного трифосфата нуклеотидного основания A, U, G или C от общего количества присутствующего трифосфата A, U, G или C. Например, комбинация: 25% 5-аминоаллил-ЦТФ+75% ЦТФ/ 25% 5-метокси-УТФ+75% УТФ относится к полинуклеотиду, где 25% цитозинтрифосфаты представляют собой 5-аминоаллил-ЦТФ, в то время как 75% цитозинов представляют собой ЦТФ; тогда как 25% урацилов представляют собой 5-метокси-УТФ, в то время как 75% урацилов представляют собой УТФ. Если в списке нет модифицированных УТФ, то встречающиеся в природе АТФ, ЦТФ, ГТФ и/или ЦТФ используются в 100% сайтов этих нуклеотидов, обнаруженных в полинуклеотиде. В этом примере все нуклеотиды ГТФ и АТФ остаются немодифицированными.

мРНК согласно данному раскрытию, или их области могут быть оптимизированы по кодонам. Методы оптимизации кодонов известны в данной области техники и могут быть полезны для различных целей: согласования частот кодонов в организмах-хозяевах для обеспечения надлежащего свертывания, сдвига в данных содержания GC для повышения стабильности мРНК или уменьшения вторичных структур, минимизации тандемных повторных кодонов или базовых прогонов, которые могут нарушать конструирование или экспрессию генов, настраивания области контроля транскрипции и трансляции, вставки или удаления последовательности переноса белков, удаления/добавления сайтов посттрансляционной модификации в кодируемых белках (например, сайты гликозилирования), добавления, удаления или перетасовке белковых доменов, вставки или удаления сайтов рестрикции, модификации сайтов связывания рибосом и сайтов деградации мРНК, регуляции скорости трансляции, чтобы позволить различным доменам белка правильно сворачиваться, или уменьшать или устранять проблемные вторичные структуры в полинуклеотиде. В данной области техники известны инструменты, алгоритмы и сервисы оптимизации; неограничивающие примеры включают сервисы от GeneArt (Life Technologies), DNA2.0 (Menlo Park, CA) и/или проприетарные методы. В одном варианте осуществления последовательность мРНК оптимизируют с использованием алгоритмов оптимизации, например, для оптимизации

экспрессии в клетках млекопитающих или повышения стабильности мРНК.

В определенных вариантах осуществления данное раскрытие включает полинуклеотиды, имеющие по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с любой из полинуклеотидных последовательностей, описанных в данном документе.

мРНК согласно данному раскрытию могут быть получены способами, доступными в данной области техники, включая, но не ограничиваясь этим, транскрипцию in vitro (IVT) и методы синтеза. Можно использовать ферментативные (IVT), твердофазные, жидкофазные, комбинированные методы синтеза, синтез малых областей и способы лигирования. В одном варианте осуществления мРНК получают с использованием методов ферментативного синтеза IVT. Способы получения полинуклеотидов с помощью IVT известны в данной области техники описаны в международной заявке PCT/US2013/30062, содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки. Соответственно, данное раскрытие также включает полинуклеотиды, например, ДНК, конструкты и векторы, которые могут быть использованы для транскрипции in vitro мРНК, описанной в данном документе.

Неприродные модифицированные нуклеотидные основания могут быть введены в полинуклеотиды, например, мРНК, во время синтеза или после синтеза. В определенных вариантах осуществления модификации могут быть на межнуклеозидных связях, пуриновых или пиримидиновых основаниях или сахаре. В конкретных вариантах осуществления модификация может быть введена на конце полинуклеотидной цепи или где-либо еще в полинуклеотидной цепи; с использованием химического синтеза или полимеразы. Примеры модифицированных нуклеиновых кислот и их синтез раскрыты в заявке PCT № PCT/US2012/058519. Синтез модифицированных полинуклеотидов также описан в Verma and Eckstein, Annual Review of Biochemistry, vol. 76, 99-134 (1998).

Для конъюгирования полинуклеотидов или их областей с различными функциональными группами, такими как нацеливающие агенты или агенты доставки, флуоресцентные метки, жидкости, наночастицы и т. д. можно использовать или методы ферментативного, или химического лигирования. Конъюгаты полинуклеотидов и модифицированных полинуклеотидов

рассматриваются в Goodchild, Bioconjugate Chemistry, vol. 1(3), 165-187 (1990).

**Сайты связывания микроРНК (миРНК)**

Полинуклеотиды согласно раскрытию могут содержать регуляторные элементы, например сайты связывания микроРНК (миРНК), сайты связывания фактора транскрипции, структурированные последовательности и/или мотивы мРНК, искусственные сайты связывания, сконструированные так, чтобы действовать в качестве псевдорецепторов для молекул, связывающих эндогенную нуклеиновую кислоту, и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, содержащие такие регуляторные элементы, упоминаются как содержащие «сенсорные последовательности». Неограничивающие примеры сенсорных последовательностей описаны в публикации США 2014/0200261, содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, рибонуклеиновая кислота (РНК), например, матричная РНК (мРНК)) согласно раскрытию содержит открытую рамку считывания (ОРС), кодирующую представляющий интерес полипептид, и дополнительно содержит один или более сайт(ов) связывания миРНК. Включение или вставка сайта(ов) связывания миРНК обеспечивает регуляцию полинуклеотидов согласно раскрытию и, в свою очередь, полипептидов, кодируемых из них, на основе тканеспецифической и/или специфической для клеточного типа экспрессии природных миРНК.

миРНК, например природная миРНК, представляет собой некодирующую РНК длиной 19-25 нуклеотидов, которая связывается с полинуклеотидом и подавляет экспрессию генов или путем снижения стабильности, или путем ингибирования трансляции полинуклеотида. Последовательность миРНК содержит «затравочную» область, то есть последовательность в области положений 2-8 зрелой миРНК. Затравочная область миРНК может содержать положения 2-8 или 2-7 зрелой миРНК. В некоторых вариантах осуществления затравочная область миРНК может содержать 7 нуклеотидов (например, нуклеотиды 2-8 зрелой миРНК), где комплементарный сайт семян в соответствующем сайте связывания миРНК фланкирован аденозином (А), противоположным положению 1 миРНК. В некоторых вариантах осуществления затравочная область миРНК может содержать 6 нуклеотидов (например, нуклеотиды 2-7 зрелой миРНК), где

комплементарный сайт семян в соответствующем сайте связывания миРНК фланкирован аденозином (A), противоположным положению 1 миРНК. См., например, Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP; Mol Cell. 2007 Jul 6;27(1):91-105. Профилирование миРНК целевых клеток или тканей может проводиться для определения наличия или отсутствия миРНК в клетках или тканях. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, рибонуклеиновая кислота (РНК), например, матричная РНК (мРНК)) согласно раскрытию содержит один или более сайтов связывания микроРНК, целевые последовательности РНК, комплементарные последовательности микроРНК или комплементарные последовательности затравочной области микроРНК. Такие последовательности могут соответствовать, например, иметь комплементарность с любой известной микроРНК, такой как те, которые описаны в публикации США US2005/0261218 и публикации США US2005/0059005, содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

Используемый в данном документе термин «сайт связывания микроРНК (миРНК или miR)» относится к последовательности в пределах полинуклеотида, например, в пределах ДНК или в пределах транскрипта РНК, в том числе в 5'-НТО и/или 3'-НТО, которая имеет достаточную комплементарность ко всей или к области миРНК для взаимодействия, соединения с или связывания с миРНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид согласно раскрытию содержит ОРС, кодирующую представляющий интерес полипептид, и дополнительно содержит один или более сайт(ов) связывания миРНК. В иллюстративных вариантах осуществления 5'-НТО и/или 3'-НТО полинуклеотида (например, рибонуклеиновой кислоты (РНК), например, матричной РНК (мРНК)) содержит один или более сайт(ов) связывания миРНК.

Сайт связывания миРНК, имеющий достаточную комплементарность с миРНК, относится к степени комплементарности, достаточной для облегчения миРНК-опосредованной регуляции полинуклеотида, например, миРНК-опосредованной репрессии трансляции или деградации полинуклеотида. В иллюстративных аспектах раскрытия, сайт связывания миРНК, имеющий достаточную комплементарность к миРНК, относится к степени комплементарности, достаточной для облегчения миРНК-опосредованной деградации полинуклеотида, например, расщепления мРНК, опосредованного направляемым миРНК

РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC). Сайт связывания миРНК может иметь комплементарность, например, с последовательностью миРНК из 19-25 нуклеотидов, с последовательностью миРНК из 19-23 нуклеотидов или с последовательностью миРНК из 22 нуклеотидов. Сайт связывания миРНК может быть комплементарен только части миРНК, например, части менее 1, 2, 3 или 4 нуклеотидов природной полноразмерной последовательности миРНК. Полная или абсолютная комплементарность (например, полная комплементарность или абсолютная комплементарность по всей или значительной части длины природной миРНК) является предпочтительной, если желаемой регуляцией является деградация мРНК.

В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК содержит последовательность, которая имеет комплементарность (например, частичную или полную комплементарность) с затравочной последовательностью миРНК. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК содержит последовательность, которая обладает полной комплементарностью с затравочной последовательностью миРНК. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК содержит последовательность, которая имеет комплементарность (например, частичную или полную комплементарность) с последовательностью миРНК. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК содержит последовательность, которая обладает полной комплементарностью с последовательностью миРНК. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК обладает полной комплементарностью с последовательностью миРНК, но для 1, 2 или 3 нуклеотидных замен, концевых добавлений и/или усечений.

В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК имеет ту же длину, что и соответствующая миРНК. В других вариантах осуществления сайт связывания миРНК на один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать или двенадцать нуклеотид(ов) короче, чем соответствующая миРНК на 5'-конце, 3'- конце или обоих. В других вариантах осуществления сайт связывания микроРНК на два нуклеотида короче, чем соответствующая микроРНК на 5'-конце, 3'-конце или обоих. Сайты связывания миРНК, которые короче, чем соответствующие миРНК, по-прежнему способны разрушать мРНК, содержащую один или более сайтов связывания миРНК, или предотвращать трансляцию мРНК.

В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК связывает соответствующую зрелую миРНК, которая является частью активного RISC, содержащего дайсер. В другом варианте осуществления связывание сайта связывания миРНК с соответствующей миРНК в RISC приводит к деградации мРНК, содержащую сайт связывания миРНК, или препятствует трансляции мРНК. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК обладает достаточной комплементарностью по отношению к миРНК, так что комплекс RISC, содержащий миРНК, расщепляет полинуклеотид, содержащий сайт связывания миРНК. В других вариантах осуществления сайт связывания миРНК имеет неполную комплементарность, так что комплекс RISC, содержащий миРНК, индуцирует нестабильность в полинуклеотиде, содержащем сайт связывания миРНК. В другом варианте осуществления сайт связывания миРНК имеет неполную комплементарность, так что комплекс RISC, содержащий миРНК, репрессирует транскрипцию полинуклеотида, содержащего сайт связывания миРНК.

В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК имеет одно, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать или двенадцать несоответствий с соответствующей миРНК.

В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК имеет по меньшей мере около десяти, по меньшей мере около одиннадцати, по меньшей мере около двенадцати, по меньшей мере около тринадцати, по меньшей мере около четырнадцати, по меньшей мере около пятнадцати, по меньшей мере около шестнадцати, по меньшей мере около семнадцати, при по меньшей мере около восемнадцати, по меньшей мере около девятнадцати, по меньшей мере около двадцати или по меньшей мере около двадцати одного смежных нуклеотидов, комплементарных по меньшей мере около десяти, по меньшей мере около одиннадцати, по меньшей мере около двенадцати, по меньшей мере около тринадцати, по меньшей мере около четырнадцати, по меньшей мере около пятнадцати, по меньшей мере около шестнадцати, по меньшей мере около семнадцати, по меньшей мере около восемнадцати, по меньшей мере около девятнадцати, по меньшей мере около двадцати или по меньшей мере около двадцати одного, соответственно, смежного нуклеотидам соответствующей миРНК.

Путем встраивания одного или более сайтов связывания миРНК в полинуклеотид согласно раскрытию, полинуклеотид может быть

нацелен на деградацию или пониженную трансляцию, при условии наличия рассматриваемой миРНК. Это может уменьшить нежелательные эффекты при доставке полинуклеотида. Например, если полинуклеотид согласно раскрытию не предназначен для доставки в ткань или клетку, но в конечном итоге является указанной тканью или клеткой, то миРНК, присутствующая в ткани или клетке, может ингибировать экспрессию представляющего интерес гена, если один или множество сайтов связывания миРНК встроены в 5'-НТО и/или 3'-НТО полинуклеотида.

Наоборот, сайты связывания миРНК могут быть удалены из полинуклеотидных последовательностей, в которых они встречаются в природе, для увеличения экспрессии белка в определенных тканях. Например, сайт связывания для конкретной миРНК может быть удален из полинуклеотида для улучшения экспрессии белка в тканях или клетках, содержащих миРНК.

В одном варианте осуществления полинуклеотид согласно раскрытию может содержать по меньшей мере один сайт связывания миРНК в 5'-НТО и/или 3'-НТО для регуляции цитотоксических или цитопротекторных терапевтических средств на основе мРНК к конкретным клеткам, таким как, но не ограничиваясь этим, нормальные клетки и/или раковые клетки. В другом варианте осуществления полинуклеотид согласно раскрытию может содержать два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более сайтов связывания миРНК в 5'-НТО и/или 3'-НТО для регуляции цитотоксических или цитопротекторных терапевтических средств на основе мРНК к конкретным клеткам, таким как, но не ограничиваясь этим, нормальные клетки и/или раковые клетки.

Регуляция экспрессии во множестве тканях может быть достигнута путем введения или удаления одного или более сайтов связывания миРНК, например, одного или более отдельных сайтов связывания миРНК. Решение о том, удалять или вставлять сайт связывания миРНК, может быть принято на основе паттернов экспрессии миРНК и/или их профилирования в тканях и/или клетках в процессе развития и/или болезни. Сообщалось об идентификации миРНК, сайтов связывания миРНК, а также об их паттернах экспрессии и роли в биологии (например, Bonauer et al., Curr Drug Targets 2010 11:943-949; Anand and Cheresh Curr Opin Hematol 2011 18:171-176; Contreras and Rao Leukemia 2012 26:404-413 (2011 Dec 20. doi: 10.1038/leu.2011.356); Bartel Cell 2009 136:215-233; Landgraf et al, Cell, 2007 129:1401-1414; Gentner

and Naldini, Tissue Antigens. 2012 80:393-403 и ссылки, цитируемые в них; каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки).

миРНК и сайты связывания миРНК могут соответствовать любой известной последовательности, включая неограничивающие примеры, описанные в публикациях США № 2014/0200261, 2005/0261218 и 2005/0059005, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки.

Примеры тканей для которых известно, что миРНК регулирует мРНК и тем самым экспрессию белка, включают, но не ограничиваются ими, печень (miR-122), мышцы (miR-133, miR-206, miR-208), эндотелиальные клетки (miR -17-92, miR-126), миелоидные клетки (miR-142-3p, miR-142-5p, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24, miR-27), жировую ткань (let-7, miR-30c), эпителиальные клетки сердца (miR-1d, miR-149), почек (miR-192, miR-194, miR-204) и легких (let-7, miR-133, miR-126).

В частности, известно, что миРНК дифференциально экспрессируются в иммунных клетках (также называемых гемопоэтическими клетками), таких как антигенпрезентирующие клетки (АПК) (например, дендритные клетки и макрофаги), макрофаги, моноциты, В-лимфоциты, Т-лимфоциты, гранулоциты, природные клетки-киллеры и т. д. миРНК, специфические для иммунных клеток, участвуют в иммуногенности, аутоиммунности, иммунном ответе на инфекцию, воспалении, а также в нежелательном иммунном ответе после генной терапии и трансплантации тканей/органов. Специфические для иммунных клеток миРНК также регулируют многие аспекты развития, пролиферации, дифференцировки и апоптоза гемопоэтических клеток (иммунных клеток). Например, miR-142 и miR-146 экспрессируются исключительно в иммунных клетках, особенно в больших количества в миелоидных дендритных клетках. Было продемонстрировано, что иммунный ответ на полинуклеотид можно блокировать путем добавления сайтов связывания miR-142 к 3'-НТО полинуклеотида, что обеспечивает более стабильный перенос генов в тканях и клетках. miR-142 эффективно разрушает экзогенные полинуклеотиды в антигенпрезентирующих клетках и подавляет цитотоксическую элиминацию трансдуцированных клеток (например, Annoni A et al., blood, 2009, 114, 5152-5161; Brown BD, et al., Nat med. 2006, 12(5), 585-591; Brown BD, et al., blood, 2007, 110(13): 4144-4152, каждый из которых включен в данный документ в полном

объеме посредством ссылки).

Антиген-опосредованный иммунный ответ может относиться к иммунному ответу, запускаемому чужеродными антигенами, которые при попадании в организм подвергаются процессингу антигенпрезентирующими клетками и отображаются на поверхности антигенпрезентирующих клеток. Т-клетки могут распознавать представленный антиген и вызывать цитотоксическую элиминацию клеток, которые экспрессируют антиген.

Введение сайта связывания miR-142 в 5'-НТО и/или 3'-НТО полинуклеотида согласно раскрытию может избирательно подавлять экспрессию гена в антигенпрезентирующих клетках посредством опосредованной miR-142 деградации, ограничивая презентацию антигена в антигенпрезентирующих клетках (например, в дендритных клетках) и тем самым предотвращая антиген-опосредованный иммунный ответ после доставки полинуклеотида. Затем полинуклеотид стабильно экспрессируется в целевых тканях или клетках без запуска цитотоксической элиминации.

В одном варианте осуществления сайты связывания для миРНК, которые, как известно, экспрессируются в иммунных клетках, в частности в антигенпрезентирующих клетках, могут быть встроены в полинуклеотид согласно раскрытию для подавления экспрессии полинуклеотида в антигенпрезентирующих клетках посредством миРНК-опосредованной деградации РНК, ослабляя антиген-опосредованный иммунный ответ. Экспрессия полинуклеотида поддерживается в неиммунных клетках, в которых специфические для иммунных клеток миРНК не экспрессируются. Например, в некоторых вариантах осуществления для предотвращения иммуногенной реакции против специфического для печени белка может быть удален любой сайт связывания miR-122, а сайт связывания miR-142 (и/или mirR-146) может быть встроен в 5'-НТО и/или 3'-НТО полинуклеотида согласно раскрытию.

Для дополнительной стимуляции селективной деградации и подавления в АПК и макрофаге, полинуклеотид согласно раскрытию может содержать дополнительный негативный регуляторный элемент в 5'-НТО и/или 3'-НТО, один или в комбинации с сайтами связывания miR-142 и/или miR-146. В качестве неограничивающего примера, еще одним негативным регуляторным элементом является конститутивный элемент деградации (CDE).

Специфические для иммунных клеток миРНК включают, но не ограничиваются ими, hsa-let-7a-2-3p, hsa-let-7a-3p, hsa-7a-5p,

hsa-let-7c, hsa-let-7e-3p, hsa-let-7e-5p, hsa-let-7g-3p, hsa-let-7g-5p, hsa-let-7i-3p, hsa-let-7i-5p, miR-10a-3p, miR-10a-5p, miR-1184, hsa-let-7f-1--3p, hsa-let-7f-2--5p, hsa-let-7f-5p, miR-125b-1-3p, miR-125b-2-3p, miR-125b-5p, miR-1279, miR-130a-3p, miR-130a-5p, miR-132-3p, miR-132-5p, miR-142-3p, miR-142-5p, miR-143-3p, miR-143-5p, miR-146a-3p, miR-146a-5p, miR-146b-3p, miR-146b-5p, miR-147a, miR-147b, miR-148a-5p, miR-148a-3p, miR-150-3p, miR-150-5p, miR-151b, miR-155-3p, miR-155-5p, miR-15a-3p, miR-15a-5p, miR-15b-5p, miR-15b-3p, miR-16-1-3p, miR-16-2-3p, miR-16-5p, miR-17-5p, miR-181a-3p, miR-181a-5p, miR-181a-2-3p, miR-182-3p, miR-182-5p, miR-197-3p, miR-197-5p, miR-21-5p, miR-21-3p, miR-214-3p, miR-214-5p, miR-223-3p, miR-223-5p, miR-221-3p, miR-221-5p, miR-23b-3p, miR-23b-5p, miR-24-1-5p, miR-24-2-5p, miR-24-3p, miR-26a-1-3p, miR-26a-2-3p, miR-26a-5p, miR-26b-3p, miR-26b-5p, miR-27a-3p, miR-27a-5p, miR-27b-3p, miR-27b-5p, miR-28-3p, miR-28-5p, miR-2909, miR-29a-3p, miR-29a-5p, miR-29b-1-5p, miR-29b-2-5p, miR-29c-3p, miR-29c-5p, miR-30e-3p, miR-30e-5p, miR-331-5p, miR-339-3p, miR-339-5p, miR-345-3p, miR-345-5p, miR-346, miR-34a-3p, miR-34a-5p, , miR-363-3p, miR-363-5p, miR-372, miR-377-3p, miR-377-5p, miR-493-3p, miR-493-5p, miR-542, miR-548b-5p, miR548c-5p, miR-548i, miR-548j, miR-548n, miR-574-3p, miR-598, miR-718, miR-935, miR-99a-3p, miR-99a-5p, miR-99b-3p и miR-99b-5p. Кроме того, новые миРНК могут быть идентифицированы в иммунных клетках посредством гибридизации на микрочипах и анализа срезов (например, Jima DD et al, Blood, 2010, 116:e118-e127; Vaz C et al., BMC Genomics, 2010, 11,288, содержание каждой из которых включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки).

миРНК, которые, как известно, экспрессируются в печени, включают, но не ограничиваются ими, miR-107, miR-122-3p, miR-122-5p, miR-1228-3p, miR-1228-5p, miR-1249, miR-129-5p, miR-1303, miR-151a-3p, miR-151a-5p, miR-152, miR-194-3p, miR-194-5p, miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-199b-3p, miR-199b-5p, miR-296-5p, miR-557, miR-581, miR-939-3p и miR-939-5p. Сайты связывания миРНК из любой специфической для печени миРНК могут быть введены или удалены из полинуклеотида согласно раскрытию для регуляции экспрессии полинуклеотида в печени. Специфические для печени сайты связывания миРНК могут быть сконструированы отдельно или дополнительно в комбинации с сайтами связывания миРНК иммунных клеток (например, АПК) в полинуклеотиде согласно раскрытию.

миРНК, которые, как известно, экспрессируются в легких, включают, но не ограничиваются ими, let-7a-2-3p, let-7a-3p, let-7a-5p, miR-126-3p, miR-126-5p, miR-127-3p, miR-127-5p, miR-130a-3p, miR-130a-5p, miR-130b-3p, miR-130b-5p, miR-133a, miR-133b, miR-134, miR-18a-3p, miR-18a-5p, miR-18b-3p, miR-18b-5p, miR-24-1-5p, miR-24-2-5p, miR-24-3p, miR-296-3p, miR-296-5p, miR-32-3p, miR-337-3p, miR-337-5p, miR-381-3p и miR-381-5p. Сайты связывания миРНК из любой специфической для легких миРНК могут быть введены или удалены из полинуклеотида согласно раскрытию для регуляции экспрессии полинуклеотида в легком. Специфические для легкого сайты связывания миРНК могут быть сконструированы отдельно или дополнительно в комбинации с сайтами связывания миРНК иммунных клеток (например, АПК) в полинуклеотиде согласно раскрытию.

миРНК, которые, как известно, экспрессируются в сердце, включают, но не ограничиваются ими, miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-149-3p, miR-149-5p, miR-186-3p, miR-186-5p, miR-208a, miR-208b, miR-210, miR-296-3p, miR-320, miR-451a, miR-451b, miR-499a-3p, miR-499a-5p, miR-499b-3p, miR-499b-5p, miR-744-3p, miR-744-5p, miR-92b-3p и miR-92b-5p. Сайты связывания миРНК из любой специфической для сердца микроРНК могут быть введены или удалены из полинуклеотида согласно раскрытию для регуляции экспрессии полинуклеотида в сердце. Специфические для сердца сайты связывания миРНК могут быть сконструированы отдельно или дополнительно в комбинации с сайтами связывания миРНК иммунных клеток (например, АПК) в полинуклеотиде согласно раскрытию.

миРНК, которые, как известно, экспрессируются в нервной системе, включают, но не ограничиваются ими, miR-124-5p, miR-125a-3p, miR-125a-5p, miR-125b-1-3p, miR-125b-2-3p, miR-125b-5p, miR-1271-3p, miR-1271-5p, miR-128, miR-132-5p, miR-135a-3p, miR-135a-5p, miR-135b-3p, miR-135b-5p, miR-137, miR-139-5p, miR-139-3p, miR-149-3p, miR-149-5p, miR-153, miR-181c-3p, miR-181c-5p, miR-183-3p, miR-183-5p, miR-190a, miR-190b, miR-212-3p, miR-212-5p, miR-219-1-3p, miR-219-2-3p, miR-23a-3p, miR-23a-5p, miR-30a-5p, miR-30b-3p, miR-30b-5p, miR-30c-1-3p, miR-30c-2-3p, miR-30c-5p, miR-30d-3p, miR-30d-5p, miR-329, miR-342-3p, miR-3665, miR-3666, miR-380-3p, miR-380-5p, miR-383, miR-410, miR-425-3p, miR-425-5p, miR-454-3p, miR-454-5p, miR-483, miR-510, miR-516a-3p, miR-548b-5p, miR-548c-5p, miR-571, miR-7-1-3p, miR-7-2-3p, miR-7-5p, miR-802, miR-922, miR-9-3p и miR-9-5p. миРНК, находящиеся

в значительном количестве в нервной системе, дополнительно включают те, которые специфически экспрессируются в нейронах, включая, но не ограничиваясь, miR-132-3p, miR-132-3p, miR-148b-3p, miR-148b-5p, miR-151a-3p, miR-151a-5p, miR-212-3p, miR-212-5p, miR-320b, miR-320e, miR-323a-3p, miR-323a-5p, miR-324-5p, miR-325, miR-326, miR-328, miR-922 и те, которые специфически экспрессируются в глиальных клетках, включая, но не ограничиваясь, miR-1250, miR-219-1-3p, miR-219-2-3p, miR-219-5p, miR-23a-3p, miR-23a-5p, miR-3065-3p, miR-3065-5p, miR-30e-3p, miR-30e-5p, miR-32-5p, miR-338-5p и miR-657. Сайты связывания миРНК из любой специфической для ЦНС миРНК могут быть введены или удалены из полинуклеотида согласно раскрытию для регуляции экспрессии полинуклеотида в нервной системе. Специфические для нервной системы сайты связывания миРНК могут быть сконструированы отдельно или дополнительно в комбинации с сайтами связывания миРНК иммунных клеток (например, АПК) в полинуклеотиде согласно раскрытию.

миРНК, которые, как известно, экспрессируются в поджелудочной железе, включают, но не ограничиваются ими, miR-105-3p, miR-105-5p, miR-184, miR-195-3p, miR-195-5p, miR-196a-3p, miR-196a-5p, miR-214-3p, miR-214-5p, miR-216a-3p, miR-216a-5p, miR-30a-3p, miR-33a-3p, miR-33a-5p, miR-375, miR-7-1-3p, miR-7-2-3p, miR-493-3p, miR-493-5p и miR-944. Сайты связывания миРНК из любой специфической для миРНК поджелудочной железы могут быть введены или удалены из полинуклеотида согласно раскрытию для регуляции экспрессии полинуклеотида в поджелудочной железе. Специфические для поджелудочной железы сайты связывания миРНК могут быть сконструированы отдельно или дополнительно в комбинации с сайтами связывания миРНК иммунных клеток (например, АПК) в полинуклеотиде согласно раскрытию.

миРНК, которые, как известно, экспрессируются в почках, включают, но не ограничиваются ими, miR-122-3p, miR-145-5p, miR-17-5p, miR-192-3p, miR-192-5p, miR-194-3p, miR-194-5p, miR-20a-3p, miR-20a-5p, miR-204-3p, miR-204-5p, miR-210, miR-216a-3p, miR-216a-5p, miR-296-3p, miR-30a-3p, miR-30a-5p, miR-30b-3p, miR-30b-5p, miR-30c-1-3p, miR-30c-2-3p, miR30c-5p, miR-324-3p, miR-335-3p, miR-335-5p, miR-363-3p, miR-363-5p и miR-562. Сайты связывания миРНК из любой специфической для почки миРНК могут быть введены или удалены из полинуклеотида согласно раскрытию для регуляции экспрессии полинуклеотида в почке. Специфические

для почки сайты связывания миРНК могут быть сконструированы отдельно или дополнительно в комбинации с сайтами связывания миРНК иммунных клеток (например, АПК) в полинуклеотиде согласно раскрытию.

миРНК, которые, как известно, экспрессируются в мышцах, включают, но не ограничиваются ими, let-7g-3p, let-7g-5p, miR-1, miR-1286, miR-133a, miR-133b, miR-140-3p, miR-143-3p, miR-143-5p, miR-145-3p, miR-145-5p, miR-188-3p, miR-188-5p, miR-206, miR-208a, miR-208b, miR-25-3p и miR-25-5p. Сайты связывания миРНК из любой специфической для мышц миРНК могут быть введены или удалены из полинуклеотида согласно раскрытию для регуляции экспрессии полинуклеотида в мышце. Специфические для мышц сайты связывания миРНК могут быть сконструированы отдельно или дополнительно в комбинации с сайтами связывания миРНК иммунных клеток (например, АПК) в полинуклеотиде согласно раскрытию.

миРНК также дифференцировано экспрессируются в различных типах клеток, таких как, но не ограничиваясь ими, эндотелиальные клетки, эпителиальные клетки и адипоциты.

миРНК, которые, как известно, экспрессируются в эндотелиальных клетках, включают, но не ограничиваются ими, let-7b-3p, let-7b-5p, miR-100-3p, miR-100-5p, miR-101-3p, miR-101-5p, miR-126-3p, miR-126-5p, miR-1236-3p, miR-1236-5p, miR-130a-3p, miR-130a-5p, miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18a-3p, miR-18a-5p, miR-19a-3p, miR-19a-5p, miR-19b-1-5p, miR-19b-2-5p, miR-19b-3p, miR-20a-3p, miR-20a-5p, miR-217, miR-210, miR-21-3p, miR-21-5p, miR-221-3p, miR-221-5p, miR-222-3p, miR-222-5p, miR-23a-3p, miR-23a-5p, miR-296-5p, miR-361-3p, miR-361-5p, miR-421, miR-424-3p, miR-424-5p, miR-513a-5p, miR-92a-1-5p, miR-92a-2-5p, miR-92a-3p, miR-92b-3p и miR-92b-5p. Многие новые миРНК обнаружены в эндотелиальных клетках в результате глубокого секвенирования (например, Voellenkle C. et al., RNA, 2012, 18, 472-484, включенная в данный документ в полном объеме посредством ссылки). Сайты связывания миРНК из любой специфической для эндотелиальных клеток миРНК могут быть введены или удалены из полинуклеотида согласно раскрытию для регуляции экспрессии полинуклеотида в эндотелиальных клетках.

миРНК, которые, как известно, экспрессируются в эпителиальных клетках, включают, но не ограничиваются ими, let-7b-3p, let-7b-5p, miR-1246, miR-200a-3p, miR-200a-5p, miR-200b-3p, miR-200b-5p, miR-200c-3p, miR-200c-5p, miR-338-3p, miR-429,

miR-451a, miR-451b, miR-494, miR-802 и miR-34a, miR-34b-5p, miR-34c-5p, miR-449a, miR-449b-3p, miR-449b-5p, специфические для респираторных реснитчатых эпителиальных клеток, семейство let-7, miR-133a, miR-133b, miR-126, специфические для эпителиальных клеток легкого, miR-382-3p, miR-382-5p специфические для эпителиальных клеток почки, и miR-762, специфические для эпителиальных клеток роговицы. Сайты связывания миРНК из любой специфической для эпителиальных клеток миРНК могут быть введены или удалены из полинуклеотида согласно раскрытию для регуляции экспрессии полинуклеотида в эпителиальных клетках.

Кроме того, большая группа миРНК, находящиеся в значительном количестве в эмбриональных стволовых клетках, контролируя самообновление стволовых клеток, а также развитие и/или дифференцировку различных клеточных линий, таких как нервные клетки, кардиомиоциты, гемопоэтические клетки, клетки кожи, остеогенные клетки, и мышечные клетки (например, Kuppusamy KT et al., Curr. Mol Med, 2013, 13(5), 757-764; Vidigal JA and Ventura A, Semin Cancer Biol. 2012, 22(5-6), 428-436; Goff LA et al., PLoS One, 2009, 4:e7192; Morin RD et al., Genome Res,2008,18, 610-621; Yoo JK et al., Stem Cells Dev. 2012, 21(11), 2049-2057, каждая из которых включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки). миРНК, находящиеся в значительном количестве в эмбриональных стволовых клетках, включают, но не ограничиваются ими, let-7a-2-3p, let-a-3p, let-7a-5p, let7d-3p, let-7d-5p, miR-103a-2-3p, miR-103a-5p, miR-106b-3p, miR-106b-5p, miR-1246, miR-1275, miR-138-1-3p, miR-138-2-3p, miR-138-5p, miR-154-3p, miR-154-5p, miR-200c-3p, miR-200c-5p, miR-290, miR-301a-3p, miR-301a-5p, miR-302a-3p, miR-302a-5p, miR-302b-3p, miR-302b-5p, miR-302c-3p, miR-302c-5p, miR-302d-3p, miR-302d-5p, miR-302e, miR-367-3p, miR-367-5p, miR-369-3p, miR-369-5p, miR-370, miR-371, miR-373, miR-380-5p, miR-423-3p, miR-423-5p, miR-486-5p, miR-520c-3p, miR-548e, miR-548f, miR-548g-3p, miR-548g-5p, miR-548i, miR-548k, miR-548l, miR-548m, miR-548n, miR-548o-3p, miR-548o-5p, miR-548p, miR-664a-3p, miR-664a-5p, miR-664b-3p, miR-664b-5p, miR-766-3p, miR-766-5p, miR-885-3p, miR-885-5p, miR-93-3p, miR-93-5p, miR-941,miR-96-3p, miR-96-5p, miR-99b-3p и miR-99b-5p. Многие спрогнозированные новые миРНК обнаруживаются путем глубокого секвенирования в эмбриональных стволовых клетках человека (например, Morin RD et al., Genome Res,2008,18, 610-621; Goff LA et al., PLoS One,

2009, 4:e7192; Bar M et al., Stem cells, 2008, 26, 2496-2505, содержание каждой из которых включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки).

В одном варианте осуществления сайты связывания специфических для эмбриональных стволовых клеток миРНК могут быть включены или удалены из 3'-НТО полинуклеотида согласно раскрытию для модуляции развития и/или дифференцировки эмбриональных стволовых клеток, чтобы ингибировать старение стволовых клеток при дегенеративном состоянии (например, дегенеративные заболевания) или для стимуляции старения и апоптоза стволовых клеток при патологическом состоянии (например, раковых стволовых клеток).

Многие исследования экспрессии миРНК проводятся для профилирования дифференциальной экспрессии миРНК в различных раковых клетках/тканях и других заболеваниях. Некоторые миРНК аномально сверхэкспрессируются в определенных раковых клетках, а другие недостаточно экспрессируются. Например, миРНК дифференциально экспрессируются в раковых клетках (WO2008/154098, US2013/0059015, US2013/0042333, WO2011/157294); раковых стволовых клетках (US2012/0053224); злокачественных новообразованиях и заболеваниях поджелудочной железы (US2009/0131348, US2011/0171646, US2010/0286232, US8389210); астме и воспалении (US8415096); раке простаты (US2013/0053264); гепатоцеллюлярной карциноме (WO2012/151212, US2012/0329672, WO2008/054828, US8252538); клетки рака легкого (WO2011/076143, WO2013/033640, WO2009/070653, US2010/0323357); Т-клеточной лимфоме кожи (WO2013/011378); клетки колоректального рака (WO2011/0281756, WO2011/076142); лимфатических узлах положительных по раку (WO2009/100430, US2009/0263803); раке носоглотки (EP2112235); хронической обструктивной болезни легких (US2012/0264626, US2013/0053263); раке щитовидной железы (WO2013/066678); клетках рака яичников ( US2012/0309645, WO2011/095623); клетках рака молочной железы (WO2008/154098, WO2007/081740, US2012/0214699), лейкозе и лимфоме (WO2008/073915, US2009/0092974, US2012/0316081, US2012/0283310, WO2010/018563), содержание каждой из которых включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

В качестве неограничивающего примера, сайты связывания миРНК для миРНК, которые сверхэкспрессируются в определенных раковых и/или опухолевых клетках, могут быть удалены из 3'-НТО

полинуклеотида согласно раскрытию, восстанавливая экспрессию, подавленную сверхэкспрессированными миРНК, в раковых клетках, таким образом улучшая соответствующую биологическую функцию, например, стимуляцию и/или репрессию транскрипции, остановку клеточного цикла, апоптоз и гибель клеток. Нормальные клетки и ткани, в которых экспрессия миРНК не повышена, останутся без изменений.

миРНК также может регулировать сложные биологические процессы, такие как ангиогенез (например, miR-132) (Anand и Cheresh Curr Opin Hematol 2011 18:171-176). В полинуклеотидах согласно раскрытию сайты связывания миРНК, которые участвуют в таких процессах, могут быть удалены или введены для того, чтобы адаптировать экспрессию полинуклеотидов к биологически соответствующим типам клеток или соответствующим биологическим процессам. В этом контексте полинуклеотиды согласно раскрытию определяются как ауксотрофные полинуклеотиды.

В некоторых вариантах терапевтическое окно и/или дифференциальная экспрессия (например, тканеспецифическая экспрессия) полипептида согласно раскрытию может быть изменена путем включения сайта связывания миРНК в мРНК, кодирующую полипептид. В одном примере мРНК может содержать один или более сайтов связывания миРНК, которые связаны миРНК, которые имеют более высокую экспрессию в одном типе ткани по сравнению с другим. В другом примере мРНК может содержать один или более сайтов связывания миРНК, которые связаны миРНК, которые имеют более низкую экспрессию в раковой клетке по сравнению с нераковой клеткой той же ткани по происхождению. Когда он присутствует в раковой клетке, которая экспрессирует низкие уровни такой миРНК, полипептид, кодируемый мРНК, обычно проявляет повышенную экспрессию.

Клетки рака печени (например, клетки гепатоцеллюлярной карциномы) обычно экспрессируют низкие уровни miR-122 по сравнению с нормальными клетками печени. Следовательно, мРНК, кодирующая полипептид, который содержит по меньшей мере один сайт связывания miR-122 (например, в 3'-НТО мРНК), обычно будет экспрессировать сравнительно низкие уровни полипептида в нормальных клетках печени и сравнительно высокие уровни полипептида в раковых клетках печени.

В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит по меньшей мере один сайт связывания miR-122, по меньшей мере два

сайта связывания miR-122, по меньшей мере три сайта связывания miR-122, по меньшей мере четыре miR-122 или по меньшей мере пять сайтов связывания miR-122. В одном аспекте сайт связывания миРНК связывает miR-122 или является комплементарным к miR-122. В другом аспекте сайт связывания миРНК связывается с miR-122-3p или miR-122-5p. В конкретном аспекте сайт связывания миРНК содержит нуклеотидную последовательность на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичную SEQ ID NO: 175, причем сайт связывания миРНК связывается с miR-122. В другом аспекте сайт связывания миРНК содержит нуклеотидную последовательность на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичную SEQ ID NO: 173, причем сайт связывания миРНК связывается с miR-122. Данные последовательности приведены ниже в Таблице 3.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид согласно раскрытию содержит сайт связывания миРНК, причем сайт связывания миРНК содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, выбранных из Таблицы 3, включая одну или более копий любой одной или более последовательностей сайта связывания миРНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид согласно раскрытию дополнительно содержит по меньшей мере один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более одинаковых или разных сайтов связывания миРНК, выбранных из Таблицы 3, включая любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК связывается с miR-142 или является комплементарным к miR-142. В некоторых вариантах осуществления miR-142 содержит SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК связывается с miR-142-3p или miR-142-5p. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания miR-142-3p содержит SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания miR-142-5p содержит SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК содержит нуклеотидную последовательность на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичную SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 31

.

**Таблица 3.** Репрезентативные микроРНК и сайты связывания микроРНК

| SEQ ID NO. | Описание | Последовательность |
|---|---|---|
| 127 | mmiR-142 | GACAGUGCAGUCACCCAUAAAGUAGAAAGCACUACUA ACAGCACUGGAGGGUGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA UGAGUGUACUGUG |
| 128 | mmiR-142-3p | UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA |
| 129 | сайт связывания mmiR-142-3p | UCCAUAAAGUAGGAAACACUACA |
| 130 | mmiR-142-5p | CAUAAAGUAGAAAGCACUACU |
| 131 | сайт связывания mmiR-142-5p | AGUAGUGCUUUCUACUUUAUG |
| 171 | miR-122 | CCUUAGCAGAGCUGUGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGU GUCUAAACUAUCAAACGCCAUUAUCACACUAAAUAGC UACUGCUAGGC |
| 172 | miR-122-3p | AACGCCAUUAUCACACUAAAUA |
| 173 | сайт связывания miR-122-3p | UAUUUAGUGUGAUAAUGGCGUU |
| 174 | miR-122-5p | UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG |
| 175 | сайт связывания miR-122-5p | CAAACACCAUUGUCACACUCCA |

В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК вставляют в полинуклеотид согласно раскрытию в любом положении полинуклеотида (например, 5'-НТО и/или 3'-НТО). В некоторых вариантах осуществления 5'-НТО содержит сайт связывания миРНК. В некоторых вариантах осуществления 3'-НТО содержит сайт связывания миРНК. В некоторых вариантах осуществления 5'-НТО и 3'-НТО содержат сайт связывания миРНК. Сайт вставки в полинуклеотид может находиться где угодно в полинуклеотиде, пока вставка сайта связывания миРНК в полинуклеотид не мешает трансляции функционального полипептида в отсутствии соответствующей миРНК; и в присутствии миРНК вставка сайта связывания миРНК в полинуклеотид и связывание сайта связывания миРНК с соответствующей миРНК способны расщеплять полинуклеотид или предотвращать трансляцию полинуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК вставляют через по меньшей мере около 30 нуклеотидов по ходу транскрипции от стоп-кодона ОРС в полинуклеотиде согласно раскрытию, который содержит ОРС. В некоторых вариантах

осуществления сайт связывания миРНК вставляют через по меньшей мере около 10 нуклеотидов, по меньшей мере около 15 нуклеотидов, по меньшей мере около 20 нуклеотидов, по меньшей мере около 25 нуклеотидов, по меньшей мере около 30 нуклеотидов, по меньшей мере около 35 нуклеотидов, по меньшей мере около 40 нуклеотидов, по меньшей мере около 45 нуклеотидов, по меньшей мере около 50 нуклеотидов, по меньшей мере около 55 нуклеотидов, по меньшей мере около 60 нуклеотидов, по меньшей мере около 65 нуклеотидов, по меньшей мере около 70 нуклеотидов, по меньшей мере около 75 нуклеотидов, по меньшей мере около 80 нуклеотидов, по меньшей мере около 85 нуклеотидов, по меньшей мере около 90 нуклеотидов, по меньшей мере около 95 нуклеотидов или по меньшей мере около 100 нуклеотидов по ходу транскрипции от стоп-кодона ОРС в полинуклеотиде согласно раскрытию. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК вставляют через от около 10 нуклеотидов до около 100 нуклеотидов, от около 20 нуклеотидов до около 90 нуклеотидов, от около 30 нуклеотидов до около 80 нуклеотидов, от около 40 нуклеотидов до около 70 нуклеотидов, от около 50 нуклеотидов до около 60 нуклеотидов, от около 45 нуклеотидов до около 65 нуклеотидов по ходу транскрипции от стоп-кодона ОРС в полинуклеотиде согласно раскрытию.

На генную регуляцию миРНК может влиять последовательность, окружающая миРНК, такая как, но не ограничиваясь, вид окружающей последовательности, тип последовательности (например, гетерологичная, гомологичная, экзогенная, эндогенная или искусственная), регуляторные элементы в окружающей последовательности и/или структурные элементы в окружающей последовательности. На миРНК может влиять 5'-НТО и/или 3'-НТО. В качестве неограничивающего примера, 3'-НТО, не принадлежащая человеку, может усиливать регуляторный эффект последовательности миРНК на экспрессию представляющего интерес полипептида по сравнению с 3'-НТО человека того же типа последовательности.

В одном варианте осуществления другие регуляторные элементы и/или структурные элементы 5'-НТО могут влиять на миРНК-опосредованную регуляцию генов. Одним из примеров регуляторного элемента и/или структурного элемента является структурированный IRES (участок внутренней посадки рибосомы) в 5'-НТО, который необходим для связывания фактор элонгации трансляции для инициации трансляции белка. Связывание EIF4A2 с этим вторично структурированным элементом в 5'-НТО является необходимым для

миРНК-опосредованной экспрессии генов (Meijer HA et al., Science, 2013, 340, 82-85, включенная в данный документ во всей полноте посредством ссылки). Полинуклеотиды согласно раскрытию могут, кроме того, содержать эту структурированную 5'-НТО для усиления микроРНК-опосредованной регуляции генов.

По меньшей мере один сайт связывания миРНК может быть встроен в 3'-НТО полинуклеотида согласно раскрытию. В этом контексте по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять, по меньшей мере десять или более сайтов связывания миРНК могут быть встроены в 3'-НТО полинуклеотида согласно раскрытию. Например, от 1 до 10, от 1 до 9, от 1 до 8, от 1 до 7, от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3, 2 или 1 сайтов связывания миРНК могут быть встроены в 3'-НТО полинуклеотида согласно раскрытию. В одном варианте осуществления сайты связывания миРНК, включенные в полинуклеотид согласно раскрытию, могут быть одинаковыми или могут быть разными сайтами миРНК. Комбинация различных сайтов связывания миРНК, включенных в полинуклеотид согласно раскрытию, может содержать комбинации, в которые включено более одной копии любого из различных сайтов миРНК. В другом варианте осуществления сайты связывания миРНК, включенные в полинуклеотид согласно раскрытию, могут нацеливаться на одни и те же или разные ткани в организме. В качестве неограничивающего примера уровень экспрессии в определенных типах клеток (например, гепатоцитах, миелоидных клетках, эндотелиальных клетках, раковых клетках и т. д.) может быть уменьшен посредством введения сайтов связывания миРНК, специфических для ткани, типа клеток или заболевания, в 3'-НТО полинуклеотида согласно раскрытию.

В одном варианте осуществления сайт связывания миРНК может быть встроен вблизи 5'-конца 3'-НТО, примерно посередине между 5'-концом и 3'-концом 3'-НТО и/или рядом с 3'-концом 3'-НТО в полинуклеотиде согласно раскрытию. В качестве неограничивающего примера сайт связывания миРНК может быть встроен вблизи 5'-конца 3'-НТО и примерно посередине между 5'-концом и 3'-концом 3'-НТО. В качестве другого неограничивающего примера сайт связывания миРНК может быть встроен вблизи 3'-конца 3'-НТО и примерно посередине между 5'-концом и 3'-концом 3'-НТО. В качестве еще одного другого неограничивающего примера сайт связывания миРНК

может быть встроен около 5'-конца 3'-НТО и около 3'-конца 3'-НТО.

В другом варианте осуществления 3'-НТО может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 сайтов связывания миРНК. Сайты связывания миРНК могут быть комплементарны последовательности миРНК, затравочной последовательности миРНК и/или последовательностям миРНК, фланкирующим затравочную последовательность.

В одном варианте осуществления полинуклеотид согласно раскрытию может быть сконструирован так, чтобы содержать более одного сайта миРНК, экспрессируемого в разных тканях или разных типах клеток субъекта. В качестве неограничивающего примера, полинуклеотид согласно раскрытию может быть сконструирован так, чтобы содержать miR-192 и miR-122 для регуляции экспрессии полинуклеотида в печени и почках субъекта. В другом варианте осуществления полинуклеотид согласно раскрытию может быть сконструирован так, чтобы содержать более одного сайта миРНК для одной и той же ткани.

В некоторых вариантах осуществления терапевтическое окно и/или дифференциальная экспрессия, связанная с полипептидом, кодируемым полинуклеотидом согласно раскрытию, может быть изменено сайтом связывания миРНК. Например, полинуклеотид, кодирующий полипептид, который обеспечивает сигнал смерти, может быть сконструирован для более высокой экспрессии в раковых клетках благодаря сигнатуре миРНК этих клеток. В тех случаях, когда раковая клетка экспрессирует более низкий уровень конкретной миРНК, полинуклеотид, кодирующий сайт связывания для данной миРНК (или миРНК), будет экспрессироваться более высоко. Следовательно, полипептид, который обеспечивает сигнал смерти, запускает или индуцирует клеточную гибель в раковой клетке. Соседние неопухолевые клетки, имеющие более высокую экспрессию той же самой миРНК, будут менее подвержены влиянию закодированного сигнала смерти, поскольку полинуклеотид будет экспрессироваться на более низком уровне из-за эффектов связывания миРНК с сайтом связывания или «сенсором», закодированным в 3'-НТО. И наоборот, сигналы выживания клеток или цитопротекторные сигналы могут быть доставлены в ткани, содержащие раковые и нераковые клетки, причем миРНК имеет более высокую экспрессию в раковых клетках – в результате снижается сигнал выживания для раковых клеток и увеличивается сигнал

выживания для нормальных клеток. Может быть сконструировано и введено множество полинуклеотидов, имеющих разные сигналы, основанные на использовании сайтов связывания миРНК, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления экспрессию полинуклеотида согласно раскрытию можно контролировать путем включения по меньшей мере одной сенсорной последовательности в полинуклеотид и приготовления полинуклеотида в форме для введения. В качестве неограничивающего примера полинуклеотид согласно раскрытию может быть нацелен на ткань или клетку путем включения сайта связывания миРНК и заключения полинуклеотида в липидную наночастицу, содержащую катионный липид, включая любой из липидов, описанных в данном документе.

Полинуклеотид согласно раскрытию может быть сконструирован для более локальной экспрессии в конкретных тканях, типах клеток или биологических условиях на основе паттернов экспрессии миРНК в различных тканях, типах клеток или биологических условий. Посредством введения тканеспецифических сайтов связывания миРНК полинуклеотид согласно раскрытию может быть сконструирован для оптимальной экспрессии белка в ткани или клетке или в контексте биологического состояния.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид согласно раскрытию может быть сконструирован так, чтобы содержать сайты связывания миРНК, которые или имеют 100% идентичность с известными затравочными последовательностями миРНК, или имеют идентичность менее 100% с затравочными последовательностями миРНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид согласно раскрытию может быть сконструирован для включения сайтов связывания миРНК, которые имеют по меньшей мере: 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с известными затравочными последовательностями миРНК. Затравочная последовательность миРНК может быть частично мутирована для уменьшения аффинности связывания миРНК и, как таковая, приводит к уменьшенной ингибирующей модуляции полинуклеотида. По сути, степень соответствия или несоответствия между сайтом связывания миРНК и затравочной областью миРНК может действовать как реостат для более тонкой настройки способности миРНК модулировать экспрессию белка. Кроме того, мутация в незатравочной области сайта связывания миРНК также может влиять на способность миРНК модулировать экспрессию белка.

В одном варианте осуществления последовательность миРНК может быть включена в петлю шпильки.

В другом варианте осуществления затравочная последовательность миРНК может быть включена в петлю шпильки, а сайт связывания миРНК может быть включена в 5' или 3' стебля шпильки.

В одном варианте осуществления усиливающий трансляцию элемент (TEE), может быть включен в 5'-конец стебля шпильки, и затравочная область миРНК может быть включена в стебель шпильки. В другом варианте осуществления TEE может быть включен в 5'-конец стебля шпильки, затравочная область миРНК может быть включена в стебель шпильки, а сайт связывания миРНК может быть включен в 3'-конец стебля или последовательность после шпильки. Затравочная область миРНК и сайт связывания миРНК могут иметь одинаковые и/или разные последовательности миРНК.

В одном варианте осуществления включение последовательности миРНК и/или последовательности TEE изменяет форму области шпильки, что может увеличивать и/или уменьшать трансляцию. (см., например, Kedde et al., "A Pumilio-induced RNA structure switch in p27-3'UTR controls miR-221 and miR-22 accessibility." Nature Cell Biology. 2010, включенная в данный документ в полном объеме посредством ссылки).

В одном варианте осуществления 5'-НТО полинуклеотида согласно раскрытию может содержать по меньшей мере одну последовательность миРНК. Последовательность миРНК может представлять собой, но не ограничивается этим, последовательность из 19 или 22 нуклеотидов и/или последовательность миРНК без затравочной области.

В одном варианте осуществления последовательность миРНК в 5'-НТО может быть использована для стабилизации полинуклеотида согласно раскрытию, описанному в данном документе.

В другом варианте осуществления последовательность миРНК в 5'-НТО полинуклеотида согласно раскрытию может быть использована для уменьшения доступности сайта инициации трансляции, такого как, но не ограничиваясь, стартовый кодон. Смотрите, например, Matsuda et al., PLoS One. 2010 11(5):e15057; включенную в данное описание в полном объеме посредством ссылки, в которой используются олигонуклеотиды и комплексы соединения экзона (EJC) около стартового кодона (от -4 до +37, где A кодонов AUG равен +1) антисмысловых закрытых нуклеиновых кислот (LNA), чтобы

уменьшить доступ к первому стартовому кодону (AUG). Matsuda продемонстрировал, что изменение последовательности около стартового кодона с помощью LNA или EJC влияет на эффективность, длину и структурную стабильность полинуклеотида. Полинуклеотид согласно раскрытию может содержать последовательность миРНК вместо последовательности LNA или EJC, описанной Matsuda et al., около сайта инициации трансляции, чтобы уменьшить доступ к сайту инициации трансляции. Сайт инициации трансляции может быть до, после или внутри последовательности миРНК. В качестве неограничивающего примера сайт инициации трансляции может быть расположен в последовательности миРНК, такой как затравочная последовательность или сайт связывания. В качестве другого неограничивающего примера сайт инициации трансляции может быть расположен в последовательности miR-122, такой как затравочная последовательность или сайт связывания mir-122.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид согласно раскрытию может содержать по меньшей мере одну миРНК для ослабления презентации антигена антигенпрезентирующими клетками. миРНК может представлять собой полную последовательность миРНК, затравочную последовательность миРНК, последовательность миРНК без затравочной области или их комбинацию. В качестве неограничивающего примера миРНК, включенная в полинуклеотид согласно раскрытию, может быть специфической для системы кроветворения. В качестве другого неограничивающего примера миРНК, включенная в полинуклеотид согласно раскрытию для ослабления презентации антигена, представляет собой miR-142-3p.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид согласно раскрытию может содержать по меньшей мере одну миРНК для ослабления экспрессии кодируемого полипептида в представляющей интерес ткани или клетке. В качестве неограничивающего примера, полинуклеотид согласно раскрытию может содержать по меньшей мере один сайт связывания miR-122 для ослабления экспрессии представляющего интерес кодируемого полипептида в печени. В качестве другого неограничивающего примера полинуклеотид согласно раскрытию может содержать по меньшей мере один сайт связывания miR-142-3p, затравочную последовательность miR-142-3p, сайт связывания miR-142-3p без затравочной области, сайт связывания miR-142-5p, затравочную последовательность miR-142-5p, сайт связывания miR-142-5p без затравочной области, сайт связывания miR-146, затравочную последовательность miR-146 и/или

сайт связывания miR-146 без затравочной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид согласно раскрытию может содержать по меньшей мере один сайт связывания миРНК в 3'-НТО для селективной деградации терапевтических средств на основе мРНК в иммунных клетках, чтобы вызывать нежелательные иммуногенные реакции, вызванные доставкой терапевтических средств. В качестве неограничивающего примера сайт связывания миРНК может сделать полинуклеотид согласно раскрытию более нестабильным в антигенпрезентирующих клетках. Неограничивающие примеры этих миРНК включают mir-142-5p, mir-142-3p, mir-146a-5p и mir-146-3p.

В одном варианте осуществления полинуклеотид согласно раскрытию содержит по меньшей мере одну последовательность миРНК в области полинуклеотида, которая может взаимодействовать с РНК-связывающим белком.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид согласно раскрытию (например, РНК, например, мРНК) содержит (i) нуклеотидную последовательность с оптимизированной последовательностью (например, ОРС) и (ii) сайт связывания миРНК (например, сайт связывания миРНК, который связывается с miR-142).

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид согласно раскрытию содержит модифицированную урацилом последовательность, кодирующую полипептид, описанный в данном документе, и сайт связывания миРНК, раскрытый в данным документе, например, сайт связывания миРНК, который связывается с miR-142 или miR-122. В некоторых вариантах осуществления модифицированная урацилом последовательность, кодирующая полипептид, содержит по меньшей мере одно химически модифицированное нуклеотидное основание, например, 5-метоксиурацил. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 95% типа нуклеотидного основания (например, урацила) в модифицированной урацилом последовательности, кодирующей полипептид согласно раскрытию, представляет собой модифицированные нуклеотидные основания. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 95% урацила в модифицированной урацилом последовательности, кодирующей полипептид, представляет собой 5-метоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, раскрытый в данном документе, и сайт связывания миРНК, составляют с агентом доставки, например,

соединением, имеющим формулу (I), например, любого из соединений 1-147.

**Модифицированные полинуклеотиды, содержащие функциональные элементы РНК**

Данное раскрытие обеспечивает синтетические полинуклеотиды, содержащие модификацию (например, элемент РНК), причем модификация обеспечивает желаемую трансляционную регуляторную активность. В некоторых вариантах осуществления раскрытие обеспечивает полинуклеотид, содержащий 5'-нетранслируемую область (НТО), инициирующий кодон, полноразмерную открытую рамку считывания, кодирующую полипептид, 3'-НТО и по меньшей мере одну модификацию, причем по меньшей мере одна модификация обеспечивает желательную трансляционную регуляторную активность, например, модификацию, которая способствует и/или повышает точность трансляции мРНК. В некоторых вариантах осуществления желательная трансляционная регуляторная активность представляет собой цис-действующую регуляторную активность. В некоторых вариантах осуществления желаемая трансляционная регуляторная активность представляет собой увеличение времени пребывания 43S преинициирующего комплекса (PIC) или рибосомы при инициирующем кодоне или вблизи него. В некоторых вариантах осуществления желательная трансляционная регуляторная активность представляет собой увеличение инициации синтеза полипептида при или из инициирующего кодона. В некоторых вариантах осуществления желательная трансляционная регуляторная активность представляет собой увеличение количества полипептида, транслированного из полноразмерной открытой рамки считывания. В некоторых вариантах осуществления желательная трансляционная регуляторная активность представляет собой увеличение точности декодирования инициирующего кодона с помощью PIC или рибосомы. В некоторых вариантах осуществления желательная трансляционная регуляторная активность представляет собой ингибирование или уменьшение ослабленного сканирования PIC или рибосомой. В некоторых вариантах осуществления желательная трансляционная регуляторная активность представляет собой снижение скорости декодирования инициирующего кодона с помощью PIC или рибосомы. В некоторых вариантах осуществления желаемая трансляционная регуляторная активность представляет собой ингибирование или снижение инициации синтеза полипептида в любом кодоне в мРНК, кроме инициирующего кодона. В некоторых вариантах осуществления

желательная трансляционная регуляторная активность представляет собой ингибирование или уменьшение количества полипептида, транслируемого с любой открытой рамки считывания в мРНК, кроме полноразмерной открытой рамки считывания. В некоторых вариантах осуществления желательная трансляционная регуляторная активность представляет собой ингибирование или снижение продукции аберрантных продуктов трансляции. В некоторых вариантах осуществления желательная трансляционная регуляторная активность представляет собой комбинацию одной или более из вышеупомянутых трансляционных регуляторных активностей.

Соответственно, данное раскрытие обеспечивает полинуклеотид, например, мРНК, содержащую элемент РНК, который содержит последовательность и/или вторичную структуру(ы) РНК, которая обеспечивает желаемую трансляционную регуляторную активность, как описано в данном документе. В некоторых аспектах мРНК содержит элемент РНК, который содержит последовательность и/или вторичную структуру(ы) РНК, которая способствует и/или усиливает точность трансляции мРНК. В некоторых аспектах мРНК содержит элемент РНК, который содержит последовательность и/или вторичную структуру(ы) РНК, которая обеспечивает желаемую трансляционную регуляторную активность, такую как ингибирование и/или уменьшение ослабленного сканирования. В некоторых аспектах раскрытие обеспечивает мРНК, которая содержит элемент РНК, который содержит последовательность и/или вторичную структуру(ы) РНК, которая ингибирует и/или уменьшает ослабленное сканирование, тем самым способствуя точности трансляции мРНК.

В некоторых вариантах осуществления элемент РНК содержит природные и/или модифицированные нуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления элемент РНК содержит последовательность соединенных нуклеотидов или их производных или аналогов, которая обеспечивает требуемую трансляционную регуляторную активность, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления элемент РНК содержит последовательность соединенных нуклеотидов или их производных или аналогов, которая образует или сворачивается в стабильную вторичную структуру РНК, причем вторичная структура РНК обеспечивает желаемую трансляционную регуляторную активность, как описано в данном документе. Элементы РНК могут быть идентифицированы и/или охарактеризованы на основе первичной последовательности элемента (например, GC-богатого элемента), посредством вторичной

структуры РНК, образованной элементом (например, шпилькой), по расположению элемента в молекуле РНК (например, расположенной в 5'-НТО мРНК) по биологической функции и/или активности элемента (например, «элемента, усиливающего трансляцию») и любой их комбинации.

В некоторых аспектах раскрытие обеспечивает мРНК, имеющую одну или более структурных модификаций, которые ингибируют ослабленное сканирование и/или способствуют точности трансляции мРНК, причем по меньшей мере одна из структурных модификаций представляет собой GC-богатый элемент РНК. В некоторых аспектах раскрытие обеспечивает модифицированную мРНК, содержащую по меньшей мере одну модификацию, при этом по меньшей мере одна модификация представляет собой GC-богатый элемент РНК, содержащий последовательность соединенных нуклеотидов или их производных или аналогов, предшествующий консенсусной последовательности Козак в 5'-НТО мРНК. В одном варианте осуществления GC-богатый элемент РНК расположен через около 30, около 25, около 20, около 15, около 10, около 5, около 4, около 3, около 2 или около 1 нуклеотид(ов) против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак в 5'-НТО мРНК. В другом варианте осуществления GC-богатый элемент РНК расположен через 15-30, 15-20, 15-25, 10-15 или 5-10 нуклеотидов против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак. В другом варианте осуществления GC-богатый элемент РНК расположен непосредственно рядом с консенсусной последовательностью Козак в 5'-НТО мРНК.

В любом из предшествующих или связанных аспектов раскрытие обеспечивает GC-богатый элемент РНК, который содержит последовательность 3-30, 5-25, 10-20, 15-20, около 20, около 15, около 12, около 10, около 7, около 6 или около 3 нуклеотидов, их производных или аналогов, соединенных в любом порядке, при этом состав последовательности представляет собой 70-80% цитозина, 60-70% цитозина, 50% - 60% цитозина, 40-50% цитозина, 30-40% цитозиновых оснований. В любом из предшествующих или связанных аспектов раскрытие обеспечивает GC-богатый элемент РНК, который содержит последовательность 3-30, 5-25, 10-20, 15-20, около 20, около 15, около 12, около 10, около 7, около 6 или около 3 нуклеотидов, их производных или аналогов, соединенных в любом порядке, при этом состав последовательности представляет собой около 80% цитозина, около 70% цитозина, около 60% цитозина,

около 50% цитозина, около 40% цитозина или около 30% цитозина.

В любом из предшествующих или связанных аспектов раскрытие обеспечивает GC-богатый элемент РНК, который содержит последовательность из 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 нуклеотида, или их производных или аналогов, соединенных в любом порядке, при этом состав последовательности представляет собой 70-80% цитозина, 60-70% цитозина, 50% -60% цитозина, 40-50% цитозина, или 30-40% цитозина. В любом из предшествующих или связанных аспектов раскрытие обеспечивает GC-богатый элемент РНК, который содержит последовательность из 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 нуклеотида, или их производных или аналогов, соединенных в любом порядке, при этом состав последовательности представляет собой около 80% цитозина, около 70% цитозина, около 60% цитозина, около 50% цитозина, около 40% цитозина или около 30% цитозина.

В некоторых вариантах осуществления раскрытие обеспечивает модифицированную мРНК, содержащую по меньшей мере одну модификацию, при этом по меньшей мере одна модификация представляет собой GC-богатый элемент РНК, содержащий последовательность соединенных нуклеотидов или их производных или аналогов, предшествующий консенсусной последовательности Козак в 5'-НТО мРНК, причем GC-богатый элемент РНК расположен через около 30, около 25, около 20, около 15, около 10, около 5, около 4, около 3, около 2 или около 1 нуклеотид(ов) против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак в 5'-НТО мРНК, и при этом GC-богатый элемент РНК, содержит последовательность 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 , 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов или их производных или аналогов, соединенных в любом порядке, причем состав последовательности представляет собой > 50% цитозина. В некоторых вариантах осуществления композиция последовательности представляет собой >55% цитозина, >60% цитозина, >65% цитозина, >70% цитозина, >75% цитозина, >80% цитозина, >85% цитозина или >90% цитозина.

В других аспектах раскрытие обеспечивает модифицированную мРНК, содержащую по меньшей мере одну модификацию, причем по меньшей мере одна модификация представляет собой GC-богатый элемент РНК, содержащий последовательность соединенных нуклеотидов или их производных или аналогов, предшествующий

консенсусной последовательности Козак в 5'-НТО мРНК, при этом GC-богатый элемент РНК расположен через около 30, около 25, около 20, около 15, около 10, около 5, около 4, около 3, около 2 или около 1 нуклеотид(ов) против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак в 5'-НТО мРНК, и причем GC-богатый элемент РНК содержит последовательность около 3-30, 5-25, 10-20, 15-20 или около 20, около 15, около 12, около 10, около 6 или около 3 нуклеотидов или их производных или аналогов, при этом последовательность содержит повторяющийся GC-мотив, в которой повторяющийся GC-мотив представляет собой [CCG]n, где n=1-10, n=2-8, n=3-6 или n=4-5. В некоторых вариантах осуществления последовательность содержит повторяющийся GC-мотив [CCG]n, где n=1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления последовательность содержит повторяющийся GC-мотив [CCG]n, где n=1, 2 или 3. В некоторых вариантах осуществления последовательность содержит повторяющийся GC-мотив [CCG]n, где n=1. В некоторых вариантах осуществления последовательность содержит повторяющийся GC-мотив [CCG]n, где n=2. В некоторых вариантах осуществления последовательность содержит повторяющийся GC-мотив [CCG]n, где n=3. В некоторых вариантах осуществления последовательность содержит повторяющийся GC-мотив [CCG]n, где n=4 (SEQ ID NO: 177). В некоторых вариантах осуществления последовательность содержит повторяющийся GC-мотив [CCG]n, где n=5 (SEQ ID NO: 178).

В другом аспекте раскрытие обеспечивает модифицированную мРНК, содержащую по меньшей мере одну модификацию, при этом по меньшей мере одна модификация представляет собой GC-богатый элемент РНК, содержащий последовательность соединенных нуклеотидов или их производных или аналогов, предшествующий консенсусной последовательности Козак в 5'-НТО мРНК, при этом GC-богатый элемент РНК содержит любую из последовательностей, указанных в Таблице 4. В одном варианте осуществления GC-богатый элемент РНК расположен через около 30, около 25, около 20, около 15, около 10, около 5, около 4, около 3, около 2 или около 1 нуклеотид(ов) против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак в 5'-НТО мРНК. В другом варианте осуществления GC-богатый элемент РНК расположен через около 15-30, 15-20, 15-25, 10-15 или 5-10 нуклеотидов против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак. В другом варианте осуществления GC-богатый элемент РНК расположен

непосредственно рядом с консенсусной последовательностью Козак в 5'-НТО мРНК.

В других аспектах раскрытие обеспечивает модифицированную мРНК, содержащую по меньшей мере одну модификацию, причем по меньшей мере одна модификация представляет собой GC-богатый элемент РНК, содержащий последовательность V1 [CCCCGGCGCC] (SEQ ID NO: 179), как указано в Таблице 4, или их производные или аналоги, предшествующий консенсусной последовательности Козак в 5'-НТО мРНК. В некоторых вариантах осуществления GC-богатый элемент РНК содержит последовательность V1, как указано в Таблице 4, расположенную непосредственно рядом с консенсусной последовательностью Козак и против хода транскрипции от нее в 5'-НТО мРНК. В некоторых вариантах осуществления GC-богатый элемент РНК содержит последовательность V1, как указано в Таблице 4, расположенную через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 оснований против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак в 5'-НТО мРНК. В других вариантах осуществления GC-богатый элемент РНК содержит последовательность V1, как указано в Таблице 4, расположенную через 1-3, 3-5, 5-7, 7-9, 9-12 или 12-15 оснований против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак в 5'-НТО мРНК.

В других аспектах раскрытие обеспечивает модифицированную мРНК, содержащую по меньшей мере одну модификацию, при этом по меньшей мере одна модификация представляет собой GC-богатый элемент РНК, содержащий последовательность V2 [CCCCGGC], как указано в Таблице 4, или ее производные или аналоги, предшествующие консенсусной последовательности Козак в 5'-НТО мРНК. В некоторых вариантах осуществления GC-богатый элемент РНК содержит последовательность V2, как указано в Таблице 4, расположенную непосредственно рядом с консенсусной последовательностью Козак и против хода транскрипции от нее в 5'-НТО мРНК. В некоторых вариантах осуществления GC-богатый элемент РНК содержит последовательность V2, как указано в Таблице 4, расположенную через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 оснований против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак в 5'-НТО мРНК. В других вариантах осуществления GC-богатый элемент РНК содержит последовательность V2, как указано в Таблице 4, расположенную через 1-3, 3-5, 5-7, 7-9, 9-12 или 12-15 оснований против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак в 5'-НТО мРНК.

В других аспектах раскрытие обеспечивает модифицированную мРНК, содержащую по меньшей мере одну модификацию, при этом по меньшей мере одна модификация представляет собой GC-богатый элемент РНК, содержащий последовательность ЕК [GCCGCC], как указано в Таблице 4, или ее производные или аналоги, предшествующие консенсусной последовательности Козак в 5'-НТО мРНК. В некоторых вариантах осуществления GC-богатый элемент РНК содержит последовательность ЕК, как указано в Таблице 4, расположенную непосредственно рядом с консенсусной последовательностью Козак и против хода транскрипции от нее в 5'-НТО мРНК. В некоторых вариантах осуществления GC-богатый элемент РНК содержит последовательность ЕК, как указано в Таблице 4, расположенную через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 оснований против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак в 5'-НТО мРНК. В других вариантах осуществления GC-богатый элемент РНК содержит последовательность ЕК, как указано в Таблице 4, расположенную через 1-3, 3-5, 5-7, 7-9, 9-12 или 12-15 оснований против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак в 5'-НТО мРНК.

В еще других аспектах раскрытие обеспечивает модифицированную мРНК, содержащую по меньшей мере одну модификацию, причем по меньшей мере одна модификация представляет собой GC-богатый элемент РНК, содержащий последовательность V1 [CCCCGGCGCC] (SEQ ID NO: 179), как указано в Таблице 4, или их производные или аналоги, предшествующий консенсусной последовательности Козак в 5'-НТО мРНК, при этом 5'-НТО содержит следующую последовательность, приведенную в Таблице 4:

GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGA (SEQ ID NO: 180).

В некоторых вариантах осуществления GC-богатый элемент РНК содержит последовательность V1, как указано в Таблице 4, расположенную непосредственно рядом с консенсусной последовательностью Козак и против хода транскрипции от нее в последовательности 5'-НТО, приведенной в Таблице 4. В других вариантах осуществления GC-богатый элемент РНК содержит последовательность V1, как указано в Таблице 4, расположенную через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 оснований против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак в 5'-НТО мРНК, при этом 5'-НТО содержит следующую последовательность, приведенную в Таблице 4:

GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGA (SEQ ID NO: 180).

В других вариантах осуществления GC-богатый элемент РНК содержит последовательность V1, как указано в Таблице 4, расположенную через 1-3, 3-5, 5-7, 7-9, 9-12 или 12-15 оснований против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак в 5'-НТО мРНК, при этом 5'-НТО содержит следующую последовательность, приведенную в Таблице 4:

GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGA (SEQ ID NO: 180).

В некоторых вариантах осуществления 5'-НТО содержит следующую последовательность, приведенную в Таблице 4:

GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGACCCCGGCGCCGCCACC (SEQ ID NO: 181)

В некоторых вариантах осуществления 5'-НТО содержит следующую последовательность, приведенную в Таблице 4:

GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGACCCCGGCGCCACC (SEQ ID NO: 182)

**Таблица 4**

| **SEQ ID NO:** | **5'-НТО** | **Последовательность 5'-НТО** |
|---|---|---|
| 176 | Стандартный | GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACC |
| 180 | НТО | GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGA |
| 181 | V1-UTR | GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGACCCCGGCGCCGCCACC |
| 182 | V2-UTR | GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGACCCCGGCGCCACC |

| **SEQ ID NO:** | **GC-богатые элементы РНК** | **Последовательность** |
|---|---|---|
| | K0 (Традиционная консенсусная последовательность Козак) | [GCCA/GCC] |
| | EK | [GCCGCC] |

| | | |
|---|---|---|
| 179 | V1 | [CCCCGGCGCC] |
| | V2 | [CCCCGGC] |
| | $(CCG)_n$, где n=1-10 | $[CCG]_n$ |
| | $(GCC)_n$, где n=1-10 | $[GCC]_n$ |
| 177 | $(CCG)_n$, где n=4 | [CCGCCGCCGCCG] |
| 178 | $(CCG)_n$, где n=5 | [CCGCCGCCGCCGCCG] |

В другом аспекте раскрытие обеспечивает модифицированную мРНК, содержащую по меньшей мере одну модификацию, причем по меньшей мере одна модификация представляет собой GC-богатый элемент РНК, содержащий стабильную вторичную структуру РНК, содержащую последовательность нуклеотидов или их производных или аналогов, соединенных в определенном порядке, которые образует шпильку или петлю-на-стебле. В одном варианте осуществления стабильная вторичная структура РНК находится против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак. В другом варианте осуществления стабильная вторичная структура РНК расположена через около 30, около 25, около 20, около 15, около 10 или около 5 нуклеотидов против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак. В другом варианте осуществления стабильная вторичная структура РНК расположена через около 20, около 15, около 10 или около 5 нуклеотидов против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак. В другом варианте осуществления стабильная вторичная структура РНК расположена через около 5, около 4, около 3, около 2, около 1 нуклеотид против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак. В другом варианте осуществления стабильная вторичная структура РНК расположена через около 15-30, около 15-20, около 15-25, около 10-15 или около 5-10 нуклеотидов против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак. В другом варианте осуществления стабильная вторичная структура РНК расположена через 12-15 нуклеотидов против хода транскрипции от консенсусной последовательности Козак. В другом варианте осуществления стабильная вторичная структура РНК имеет $\Delta G$ около -30 ккал/моль, от около -20 до -30 ккал/моль, около -20 ккал/моль, от около -10 до -20 ккал/моль, около -10 ккал/моль, от около -5 до -10

ккал/моль.

В другом варианте осуществления модификация функционально связана с открытой рамкой считывания, кодирующей полипептид, и при этом модификация и открытая рамка считывания являются гетерологичными.

В другом варианте осуществления последовательность GC-богатого элемента РНК состоит исключительно из нуклеотидных оснований гуанина (G) и цитозина (C).

Элементы РНК, которые обеспечивают желаемую трансляционную регуляторную активность, как описано в данном документе, могут быть идентифицированы и охарактеризованы с использованием известных методов, таких как профилирование рибосом. Профилирование рибосом представляет собой метод, который позволяет определять положения PIC и/или рибосом, связанных с мРНК (см., например, Ingolia et al., (2009) Science 324 (5924):218-23, включенной в данный документ посредством ссылки). Метод основан на защите области или сегмента мРНК с помощью PIC и/или рибосомы от расщепления нуклеазой. Защита приводит к генерации фрагмента РНК длиной 30 п.н., называемого «область узнавания». Последовательность и частоту областей узнавания РНК можно анализировать способами, известными в данной области техники (например, РНК-секвенирование). Область узнавания примерно расположена по центру на A-сайте рибосомы. Если PIC или рибосома находятся в определенном положении или месте вдоль мРНК, области узнавания, генерируемые в этом положении, будут относительно распространенными. Исследования показали, что в положениях, где PIC и/или рибосома проявляют пониженную процессивность, образуется больше областей узнавания, а в положениях, где PIC и/или рибосома проявляет повышенную процессивность образуется меньше областей узнавания (Gardin et al., (2014) eLife 3:e03735). В некоторых вариантах осуществления время нахождения или время пребывания PIC или рибосомы в дискретном положении или месте вдоль полинуклеотида, содержащего любой один или более элементов РНК, описанных в данном документе, определяют с помощью профилирования рибосомы.

**Приготовление РНК высокой чистоты**

Чтобы повысить чистоту синтетически синтезированной РНК, могут быть использованы модифицированные способы транскрипции in vitro (IVT), которые производят препараты РНК, имеющие значительно отличающиеся свойства от РНК, полученной с

использованием стандартного способа IVT. Препараты РНК, полученные в соответствии с этими способами, обладают свойствами, которые позволяют получать качественно и количественно улучшенные композиции. Даже в сочетании с процессами глубокой очистки РНК, полученной с использованием стандартных способов IVT, качественно и количественно отличается от препаратов РНК, полученных с помощью модифицированных процессов IVT. Например, препараты очищенной РНК являются менее иммуногенными по сравнению с препаратами РНК, приготовленными с использованием стандартного IVT. Кроме того, повышенные уровни экспрессии белка с более высокой чистотой получают из очищенных препаратов РНК.

Стандартные реакции IVT проводят путем инкубации матрицы ДНК с РНК-полимеразой и эквимолярными количествами нуклеотидтрифосфатов, включая ГТФ, АТФ, ЦТФ и УТФ в транскрипционном буфере. В результате этой реакции получают транскрипт РНК с 5'-концевым гуанозин-трифосфатом. Эти реакции также приводят к образованию ряда примесей, таких как двухцепочечные и одноцепочечные РНК, которые являются иммуностимулирующими и могут оказывать аддитивное воздействие. Описанные в данном документе методы очистки предотвращают образование обратных комплементарных цепей и, таким образом, предотвращают распознавание врожденного иммунитета обоих видов. В некоторых вариантах осуществления модифицированные способы IVT приводят к получению РНК, обладающей значительно меньшей активностью Т-клеток, чем препарат РНК, полученный с использованием способов предшествующего уровня техники с эквимолярными количествами НТФ (нуклеозидтрифосфатов). В предшествующем уровне техники предпринимаются попытки удаления этих нежелательных компонентов с использованием ряда последующих стадий очистки. Такие способы очистки нежелательны, поскольку они требуют дополнительного времени и ресурсов, а также приводят к включению остаточных органических растворителей в конечный продукт, что нежелательно для фармацевтического продукта. Трудоемко и капиталоемко масштабировать такие процессы, как обращенно-фазовая хроматография (RP): использование, например, взрывостойких установок, колонок ВЭЖХ и систем очистки, рассчитанных на высокое давление, высокую температуру, легковоспламеняющиеся растворители и т. д. Масштаб и производительность для крупномасштабного производства ограничены

этими факторами. Последующая очистка также требуется для удаления пары ионов алкиламмония, используемой в процессе RP. В отличие от методов, описанных в данном документе, даже улучшают используемые в настоящее время способы (например, RP). Более низкая примесная нагрузка приводит к более высокому очищению и восстановлению полноразмерной РНК, лишенной контаминантов, индуцирующих цитокины, например, более высокому качеству веществ с самого начала.

Модифицированные способы IVT включают манипулирование одним или более параметрами реакции IVT, чтобы получить препарат РНК с высокофункциональной РНК без одного или более нежелательных контаминантов, полученных с использованием способов предшествующего уровня техники. Одним параметром в реакции IVT, которым можно манипулировать, является относительное количество нуклеотида или аналога нуклеотида по сравнению с одним или более другими нуклеотидами или аналогами нуклеотида в реакционной смеси (например, несопоставимые количества или концентрация нуклеотидов). Например, реакция IVT может включать избыток нуклеотидов, например нуклеотидмонофосфата, нуклеотиддифосфата или нуклеотидтрифосфата и/или избыток нуклеотидных аналогов и/или нуклеозидных аналогов. Указанные способы дают продукт с высоким выходом, который является значительно более чистым, чем продукты, полученные стандартными способами IVT.

Нуклеотидными аналогами являются соединения, которые имеют общую структуру нуклеотида или структурно сходны с нуклеотидом или его частью. В частности, нуклеотидными аналогами являются нуклеотиды, которые содержат, например, аналог нуклеиновой части, сахарной части и/или фосфатных групп нуклеотида. Нуклеотиды включают, например, нуклеотидмонофосфаты, нуклеотиддифосфаты и нуклеотидтрифосфаты. Используемый в данном документе нуклеотидный аналог структурно аналогичен нуклеотиду или его части, но не имеет типичной нуклеотидной структуры (нуклеотидное основание-рибоза-фосфат). Нуклеозидными аналогами являются соединения, которые имеют общую структуру нуклеозида или структурно сходны с нуклеозидом или его частью. В частности, нуклеозидными аналогами являются нуклеозиды, которые содержат, например, аналог нуклеиновой кислоты и/или сахарной части нуклеозида.

Нуклеотидные аналоги, используемые в способах, структурно аналогичны нуклеотидам или их частям, но, например, не

полимеризуются Т7. Используемые в данном документе нуклеотидные/нуклеозидные аналоги (включая аналоги C, T, A, U, G, dC, dT, dA, dU или dG) включают, например, противовирусные нуклеотидные аналоги, аналоги фосфатов (растворимые или иммобилизованные, гидролизуемые или негидролизуемые), динуклеотид, тринуклеотид, тетрануклеотид, например, аналог кэп-структуры, или предшественник/субстрат для ферментативного кэпирования (осповакцина или лигаза), нуклеотид, меченный функциональной группой для облегчения лигирования/конъюгации кэпа или 5'-фрагмента (IRES ), нуклеотид, меченный 5′ PO4 для облегчения лигирования кэпа или 5'-фрагмента, или нуклеотид, меченный функциональной группой/защитной группой, которая может быть химически или ферментативно расщепляемой. Противовирусные нуклеотидные/нуклеозидные аналоги включают, но не ограничиваются ими, ганцикловир, энтекавир, тельбивудин, видарабин и цидофовир.

Реакция IVT обычно включает следующее: РНК-полимеразу, например Т7 РНК-полимеразу, в конечной концентрации, например, 1000-12000 ед/мл, например, 7000 ед/мл; матрицу ДНК в конечной концентрации, например, 10-70 нМ, например, 40 нМ; нуклеотиды (НТФ) в конечной концентрации, например, 0,5-10 мМ, например, 7,5 мМ каждый; магний в конечной концентрации, например, 12-60 мМ, например, ацетат магния при 40 мМ; буфер, такой как, например, HEPES или Трис, при pH, например, 7-8,5, например, 40 мМ Трис HCl, pH 8. В некоторых вариантах осуществления могут быть включены 5 мМ дитиотреитола (DTT) и/или 1 мМ спермидина. В некоторых вариантах осуществления ингибитор РНКазы включается в реакцию IVT, чтобы гарантировать отсутствие деградации, вызванной РНКазой, во время реакции транскрипции. Например, ингибитор мышиной РНКазы можно использовать в конечной концентрации 1000 ед/мл. В некоторых вариантах осуществления пирофосфатазу включают в реакцию IVT для расщепления неорганического пирофосфата, образующегося после включения каждого нуклеотида в две единицы неорганического фосфата. Это гарантирует, что магний остается в растворе и не выпадает в осадок в виде пирофосфата магния. Например, неорганическая пирофосфатаза *E. Coli* может быть использована в конечной концентрации 1 ед/мл.

Подобно стандартным способам, модифицированный способ также может быть получен путем составления реакционной смеси, содержащей матрицу ДНК и один или более НТФ, таких как АТФ, ЦТФ,

УТФ, ГТФ (или соответствующий аналог вышеупомянутых компонентов) и буфер. Затем реакцию инкубируют в условиях, при которых РНК транскрибируется. Однако модифицированные способы используют присутствие избыточного количества одного или более нуклеотидов и/или нуклеотидных аналогов, которые могут оказывать существенное влияние на конечный продукт. Данные способы включают изменение количества (например, количества молей или количества) нуклеотидов и/или нуклеотидных аналогов в реакционной смеси. В некоторых аспектах один или более нуклеотидов и/или один или более нуклеотидных аналогов могут быть добавлены в избытке к реакционной смеси. Избыток нуклеотидов и/или нуклеотидных аналогов является любым количеством, превышающим количество одного или более других нуклеотидов, таких как НТФ, в реакционной смеси. Например, избыток нуклеотида и/или нуклеотидного аналога может быть большим, чем количество каждого или по меньшей мере одного из других отдельных НТФ в реакционной смеси, или может относиться к количеству, большему, чем эквимолярные количества других НТФ.

В варианте осуществления, когда нуклеотид и/или нуклеотидный аналог, который включен в реакционную смесь, представляет собой НТФ, НТФ может присутствовать в более высокой концентрации, чем все три других НТФ, включенных в реакционную смесь. Другие три НТФ могут находиться в эквимолярной концентрации друг к другу. Альтернативно, один или более из трех других НТФ могут иметь концентрацию, отличную от одной или более других НТФ.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления реакция IVT может включать эквимолярное количество нуклеотидтрифосфата относительно по меньшей мере одного из других нуклеотидтрифосфатов.

В некоторых вариантах осуществления РНК получают способом или ее можно получить способом, включающим

(a) составление реакционной смеси, содержащей матрицу ДНК и НТФ, включая аденозинтрифосфат (АТФ), цитидинтрифосфат (ЦТФ), уридинтрифосфат (УТФ), гуанозинтрифосфат (ГТФ) и необязательно гуанозиндифосфат (ГДФ), и (например, буфер, содержащий кофактор для Т7, например, магний).

(b) инкубацию реакционной смеси в условиях, при которых РНК транскрибируется,

причем концентрация по меньшей мере одного из ГТФ, ЦТФ, АТФ

и УТФ по меньшей мере в 2 раза выше, чем концентрация любого одного или более из АТФ, ЦТФ или УТФ, или реакционная смесь дополнительно содержит нуклеотидный аналог и при этом концентрация нуклеотидного аналога по меньшей мере в 2 раза больше, чем концентрация любого одного или более из АТФ, ЦТФ или УТФ.

В некоторых вариантах осуществления соотношение концентрации ГТФ к концентрации любого одного АТФ, ЦТФ или УТФ составляет по меньшей мере 2: 1, по меньшей мере 3: 1, по меньшей мере 4: 1, по меньшей мере 5: 1 или по меньшей мере 6: 1. Соотношение концентрации ГТФ к концентрации АТФ, ЦТФ и УТФ составляет в некоторых вариантах осуществления 2: 1, 4: 1 и 4: 1, соответственно. В других вариантах осуществления соотношение концентрации ГТФ к концентрации АТФ, ЦТФ и УТФ составляет 3: 1, 6: 1 и 6: 1, соответственно. Реакционная смесь может содержать ГТФ и ГДФ и причем соотношение концентрации ГТФ плюс ГДФ к концентрации любого из АТФ, ЦТФ или УТФ составляет по меньшей мере 2: 1, по меньшей мере 3: 1, по меньшей мере 4: 1, по меньшей мере 5: 1 или по меньшей мере 6: 1. В некоторых вариантах осуществления соотношение концентрации ГТФ плюс ГДФ к концентрации АТФ, ЦТФ и УТФ составляет 3: 1, 6: 1 и 6: 1, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления способ включает инкубацию реакционной смеси в условиях, при которых РНК транскрибируется, причем эффективная концентрация фосфата в реакции составляет по меньшей мере 150 мМ фосфата, по меньшей мере 160 мМ, по меньшей мере 170 мМ, по меньшей мере 180 мМ, по меньшей мере 190 мМ, по меньшей мере 200 мМ, по меньшей мере 210 мМ или по меньшей мере 220 мМ. Эффективная концентрация фосфата в реакции может составлять 180 мМ. Эффективная концентрация фосфата в реакции в некоторых вариантах составляет 195 мМ. В других вариантах осуществления эффективная концентрация фосфата в реакции составляет 225 мМ.

В других вариантах осуществления РНК получают способом или ее можно получить способом, включающим использование буферного магний-содержащего буфера при составлении реакционной смеси, содержащей матрицу ДНК и АТФ, ЦТФ, УТФ, ГТФ. В некоторых вариантах осуществления магний-содержащий буфер содержит Mg2+, и при этом мольное соотношение концентрации АТФ плюс ЦТФ плюс УТФ плюс ГТФ к концентрации Mg2+ составляет по меньшей мере 1,0, по

меньшей мере 1,25, по меньшей мере 1,5, по меньшей мере 1,75, по меньшей мере 1,85 по меньшей мере 3 или выше. Мольное соотношение концентрации АТФ плюс ЦТФ плюс УТФ плюс ГТФ к концентрации Mg2+ может составлять 1,5. Мольное отношение концентрации АТФ плюс ЦТФ плюс УТФ плюс ГТФ к концентрации Mg2+ в некоторых вариантах осуществления составляет 1,88. Мольное отношение концентрации АТФ плюс ЦТФ плюс УТФ плюс ГТФ к концентрации Mg2+ в некоторых вариантах осуществления составляет 3.

В некоторых вариантах осуществления композицию получают способом, который не включает стадию обработки дцРНКазой (например, РНКазой III). В других вариантах осуществления композицию получают способом, который не включает стадию очистки при помощи обращенно-фазовой (RP) хроматографии. В еще других вариантах осуществления композицию получают способом, который не включает стадию очистки при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ).

В некоторых вариантах осуществления соотношение концентрации ГТФ к концентрации любого одного АТФ, ЦТФ или УТФ составляет по меньшей мере 2: 1, по меньшей мере 3: 1, по меньшей мере 4: 1, по меньшей мере 5: 1 или по меньшей мере 6: 1 для продукции РНК.

Чистота продуктов может быть оценена с использованием известных аналитических способов и анализов. Например, количество продукта обратной транскрипции или РНК-контаминанта, индуцирующего цитокины, может быть определено с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (такой как обращенно-фазовая хроматография, эксклюзионная хроматография), системы для электрофореза на основе чипов Bioanalyzer, ИФА, проточной цитометрии, электрофореза в акриламидном геле, восстанавливающий или суррогатный тип анализа. Анализы могут быть выполнены с или без нуклеазной обработки (P1, РНКазы III, РНКазы H и т. д.) препарата РНК. Электрофоретический/хроматографический/масс-спектрометрический анализ продуктов расщепления нуклеазой также может быть выполнен.

В некоторых вариантах осуществления препараты очищенной РНК содержат загрязняющие транскрипты, которые имеют длину меньше, чем полноразмерный транскрипт, такой как, например, по меньшей мере на 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 или 900 нуклеотидов меньше, чем полноразмерный. Загрязняющие транскрипты

могут включать продукты обратной или прямой транскрипции (транскрипты), длина которых меньше полноразмерного транскрипта, например, по меньшей мере на 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 или 900 нуклеотидов меньше, чем полноразмерный. Иллюстративные прямые транскрипты включают, например, абортивные транскрипты. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит обратную комплементарную цепь трифосфатного поли-U, содержащий менее 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит обратную комплементарную цепь трифосфатного поли-U любой длины, гибридизированный с транскриптом полной длины. В других вариантах осуществления композиция содержит одноцепочечный прямой трифосфатный транскрипт. В других вариантах осуществления композиция содержит одноцепочечную РНК, имеющую концевой трифосфат-G. В других вариантах осуществления композиция содержит одноцепочечную или двухцепочечную РНК из менее чем 12 нуклеотидов или пар оснований (включая прямые или обратные транскрипты комплементарной цепи). В любом из этих вариантов осуществления композиция может включать менее 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или 0,5% любого одного из или комбинации этих транскриптов с длиной меньшей, чем у полноразмерных транскриптов.

**Средства доставки**

***Общая часть***

мРНК согласно раскрытию может быть составлена в виде наночастиц или других средств доставки, например, для защиты их от деградации при доставке субъекту. Иллюстративные наночастицы описаны в Panyam, J. & Labhasetwar, V. Adv. Drug Deliv. Rev. 55, 329-347 (2003) и Peer, D. et al. Nature Nanotech. 2, 751-760 (2007). В некоторых вариантах осуществления мРНК согласно раскрытию инкапсулируют в наночастицу. В конкретных вариантах осуществления наночастица представляет собой частицу, имеющую по меньшей мере один размер (например, диаметр), меньший или равный 1000 нМ, меньший или равный 500 нМ, или меньший или равный 100 нМ. В конкретных вариантах осуществления наночастица включает липид. Липидные наночастицы включают, но не ограничиваются ими, липосомы и мицеллы. Может присутствовать любой из ряда липидов, включая катионные и/или ионизируемые липиды, анионные липиды, нейтральные липиды, амфипатические липиды, пегилированные липиды и/или структурные липиды. Такие липиды можно использовать

отдельно или в комбинации. В конкретных вариантах осуществления липидная наночастица содержит одну или более мРНК, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления составы липидных наночастиц мРНК, описанных в данном документе, могут содержать один или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8) катионных и/или ионизируемых липидов. Такие катионные и/или ионизируемые липиды включают, но не ограничиваются ими, 3-(дидодециламин)-N1,N1,4-тридодецил-1-пиперазинэтанамин (KL10), N1-[2-(дидодециламино)этил]-N1,N4,N4-тридодецил-1,4-пиперазиндиэтанамин (KL22), 14,25-дитридецил-15,18,21,24-тетрааза-октатриаконтан (KL25), 1,2дилинолеилоксиN, Nдиметиламинопропан (DLin-DMA), 2,2дилинолеил4диметиламинометил[1,3]диоксолан (DLin-K-DMA), гептатриаконта6,9,28,31тетраен19ил 4(диметиламино)бутаноат (DLin-MC3-DMA), 2,2дилинолеил4(2диметиламиноэтил)[1,3]диоксолан (DLin-KC2-DMA), 2({8[(3β)холест5ен3илокси]октил}окси)N, Nдиметил3[(9Z,12Z)октадека9,12диен1илокси]пропан1амин (октил-CLinDMA), (2R)2({8[(3β)холест5ен3элокси]октил}окси)N, Nдиметил3[(9Z,12Z)октадека9,12диен1илокси]пропан1амин (октил-CLinDMA (2R)), (2S)2({8[(3β)холест5ен3илокси]октил}окси)N, Nдиметил3[(9Z,12Z)октадека9,12диен1илокси]пропан1амин (октил-CLinDMA (2S)).N, N-диолеил-N, N-диметиламмоний хлорид (DODAC); N-(2,3-диолеилокси)пропил-N, N--N-триметиламмоний хлорид (DOTMA); N, N-дистеарил-N, N-диметиламмоний бромид (DDAB); N-(2,3-диолеилокси)пропил)-N, N,N-триметиламмоний хлорид (DOTAP); 1,2-диолеилокси-3-триметиламинопропан гидрохлорид (DOTAP.Cl); 3-β-(N--(N',N'-диметиламиноэтан)-карбамоил)холестерин (DC-Chol), N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N-2-(сперминкарбоксамидо)этил)-N, N-диметил-аммоний трифторацетат (DOSPA), диоктадециламидоглицил карбоксиспермин (DOGS), 1,2-диолеил-3-диметиламмоний пропан (DODAP), N, N-диметил-2,3-диолеилокси)пропиламин (DODMA), и N-(1,2-димиристоилоксипроп-3-ил)-N, N-диметил-N-гидроксиэтил аммония бромид (DMRIE). Кроме того, можно использовать ряд коммерческих препаратов катионных и/или ионизируемых липидов, таких как, например, LIPOFECTIN® (включая DOTMA и DOPE, доступный от GIBCO/BRL) и LIPOFECTAMINE® (включая DOSPA и DOPE, доступный от GIBCO/BRL). KL10, KL22 и KL25 описаны, например, в патенте США № 8691750, который включен в данный документ во всей полноте посредством ссылки. В конкретных вариантах осуществления

липид представляет собой DLin-MC3-DMA или DLin-KC2-DMA.

Анионные липиды, пригодные для использования в наночастицах липидных согласно раскрытию, включают, но не ограничиваются ими, фосфатидилглицерин, кардиолипин, диацилфосфатидилсерин, диацилфосфатидную кислоту, N-додеканоил фосфатидилэтаноламин, N-сукцинил фосфатидилэтаноламин, N-глутарил фосфатидилэтаноламин, лизилфосфатидилглицерин, и другие анионные модифицированные группы, присоединенные к нейтральным липидам.

Нейтральные липиды, подходящие для применения в липидных наночастицах согласно раскрытию, включают, но не ограничиваются ими, диацилфосфатидилхолин, диацилфосфатидилэтаноламин, керамид, сфингомиелин, дигидросфингомиелин, цефалин и цереброзиды. Липиды, имеющие различные группы ацильных цепей с различной длиной цепи и степенью насыщения, доступны или могут быть выделены или синтезированы с помощью хорошо известных методик. Кроме того, могут быть использованы липиды, содержащие смеси цепей насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. В некоторых вариантах осуществления нейтральные липиды, используемые в раскрытии, представляют собой DOPE, DSPC, DPPC, POPC или любой связанный фосфатидилхолин. В некоторых вариантах осуществления нейтральный липид может состоять из сфингомиелина, дигидросфингомиелина или фосфолипидов с другими концевыми группами, такими как серин и инозит.

В некоторых вариантах осуществления амфипатические липиды включены в наночастицы согласно раскрытию. Иллюстративные амфипатические липиды, подходящие для использования в наночастицах согласно раскрытию, включают, но не ограничиваются ими, сфинголипиды, фосфолипиды и аминолипиды. В некоторых вариантах осуществления фосфолипид выбирают из группы, включающей 1,2дилинолеоилsnглицеро3фосфохолин (DLPC), 1,2димиристоилsnглицерофосфохолин (DMPC), 1,2диолеилsnглицеро3фосфохолин (DOPC), 1,2дипальмитоилsnглицеро3фосфохолин (DPPC), 1,2дистеароилsnглицеро3фосфохолин (DSPC), 1,2диундеканоилsnглицерофосфохолин (DUPC), 1пальмитоил2олеоилsnглицеро3фосфохолин (POPC), 1,2диОоктадеценилsnглицеро3фосфохолин (18:0 Diether PC), 1олеоил2холестерилгемисукциноилsnглицеро3фосфохолин (OChemsPC), 1гексадецилsnглицеро3фосфохолин (C16 Lyso PC), 1,2дилиноленоилsnглицеро3фосфохолин,

1,2диарахидоноилsnглицеро3фосфохолин,
1,2дидокозагексаеноилsnглицеро3фосфохолин,1,2диолеоилsnглицеро3фосфоэтаноламин (DOPE), 1,2дифитаноилsnглицеро3фосфоэтаноламин (ME 16.0 PE), 1,2дистеароилsnглицеро3фосфоэтаноламин,
1,2дилиноленоилsnглицеро3фосфоэтаноламин,
1,2дилиноленоилsnглицеро3фосфоэтаноламин,
1,2диарахидоноилsnглицеро3фосфоэтаноламин,
1,2дидокозагексаеноилsnглицеро3фосфоэтаноламин,
1,2диолеоилsnглицеро3фосфорац(1глицерол) хлорид натрия (DOPG), и сфингомиелин. Другие не содержащие фосфор соединения, такие как сфинголипиды, семейства гликосфинголипидов, диацилглицерины и β-ацилоксикислоты, также могут быть использованы. Кроме того, такие амфипатические липиды могут быть легко смешаны с другими липидами, такими как триглицериды и стерины.

В некоторых вариантах осуществления липидный компонент наночастицы согласно раскрытию может включать один или более пегилированных липидов. Пегилированный липид (также известный как ПЭГ-липид или ПЭГ-модифицированный липид) представляет собой липид, модифицированный полиэтиленгликолем. Липидный компонент может содержать один или более пегилированных липидов. Пегилированный липид может быть выбран из неограничивающей группы, состоящей из ПЭГ-модифицированных фосфатидилэтаноламинов, ПЭГ-модифицированных фосфатидных кислот, ПЭГ-модифицированных церамидов, ПЭГ-модифицированных диалкиламинов, ПЭГ -модифицированных диацилглицеринов и ПЭГ-модифицированных диалкилглицеринов. Например, пегилированный липид может представлять собой липид ПЭГ-с-DOMG, ПЭГ-DMG, ПЭГ-DLPE, ПЭГ-DMPE, ПЭГ-DPPC, или ПЭГ-DSPE .

Липидная наночастица согласно раскрытию может содержать один или более структурных липидов. Иллюстративные неограничивающие структурные липиды, которые могут присутствовать в липидных наночастицах согласно раскрытию, включают холестерин, фекостерин, ситостерин, кампестерин, стигмастерин, брассикастерин, эргостерин, томатидин, томатин, урсоловую кислоту или альфа-токоферол.

В некоторых вариантах осуществления одна или более мРНК согласно раскрытию могут быть составлены в липидную наночастицу, имеющую диаметр от около 1 нм до около 900 нм, например, от около 1 нм до около 100 нм, от около 1 нм до около 200 нм, от около 1 до около 300 нм, от около 1 до около 400 нм, от около 1

до около 500 нм, от около 1 до около 600 нм, от около 1 до около 700 нм, от около 1 до около 800 нм, от около 1 до около нм 900 нм. В некоторых вариантах осуществления наночастица может иметь диаметр от около 10 нм до около 300 нм, от около 20 нм до около 200 нм, от около 30 нм до около 100 нм или от около 40 нм до около 80 нм. В некоторых вариантах осуществления наночастица может иметь диаметр от около 30 нм до около 300 нм, от около 40 нм до около 200 нм, от около 50 нм до около 150 нм, от около 70 до около 110 нм или от около 80 нм до около 120 нм. В одном варианте осуществления мРНК может быть составлена в липидную наночастицу, имеющую диаметр от около 10 до около 100 нм, включая интервалы между ними, такие как, но не ограничиваясь этим, от около 10 до около 20 нм, от около 10 до около 30 нм, от около 10 до около 40 нм, от около 10 до около 50 нм, от около 10 до около 60 нм, от около 10 до около 70 нм, от около 10 до около 80 нм, от около 10 до около 90 нм, от около 20 до около 30 нм, около 20 до около 40 нм, от около 20 до около 50 нм, от около 20 до около 60 нм, от около 20 до около 70 нм, от около 20 до около 80 нм, от около 20 до около 90 нм, от около 20 до около 100 нм, от около 30 до около 40 нм, от около 30 до около 50 нм, от около 30 до около 60 нм, от около 30 до около 70 нм, от около 30 до около 80 нм, от около 30 до около 90 нм, от около 30 до около 100 нм, от около 40 до около 50 нм, от около 40 до около 60 нм, от около 40 до около 70 нм, от около 40 до около 80 нм, от около 40 до около 90 нм, от около 40 до около 100 нм, от около 50 до около 60 нм, от около 50 до около 70 нм, от около 50 до около 80 нм, от около 50 до около 90 нм, от около 50 до около 100 нм, от около 60 до около 70 нм, от около 60 до около 80 нм, от около 60 до около 90 нм, от около 60 до около 100 нм, от около 70 до около 80 нм, от около 70 до около 90 нм, от около 70 до около 100 нм, от около 80 до около 90 нм, от около 80 до около 100 нм и/или от около 90 до около 100 нм. В одном варианте осуществления мРНК может быть составлена в липидную наночастицу, имеющую диаметр от около 30 нм до около 300 нм, от около 40 нм до около 200 нм, от около 50 нм до около 150 нм, от около 70 до около 110 нм или от около 80 нм до около 120 нм, включая диапазоны между ними.

В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица может иметь диаметр более 100 нм, более 150 нм, более 200 нм, более 250 нм, более 300 нм, более 350 нм, более 400 нм, более

450 нм более 500 нм, более 550 нм, более 600 нм, более 650 нм, более 700 нм, более 750 нм, более 800 нм, более 850 нм, более 900 нм или более 950 нм.

В некоторых вариантах осуществления размер липидной наночастицы может быть увеличен и/или уменьшен. Изменение размера частиц может помочь противодействовать биологической реакции, такой как, но не ограничиваясь этим, воспаление, или может увеличить биологический эффект мРНК, доставляемой пациенту или субъекту.

В определенных вариантах осуществления желательно нацеливать наночастицу, например, липидную наночастицу согласно раскрытию, с использованием нацеливающего фрагмента, который специфичен для типа клеток и/или типа ткани. В некоторых вариантах осуществления наночастица может быть нацелена на конкретную клетку, ткань и/или орган с использованием нацеливающего фрагмента. В конкретных вариантах осуществления наночастица содержит одну или более мРНК, описанных в данном документе, и нацеливающий фрагмент. Иллюстративные неограничивающие нацеливающие фрагменты включают лиганды, рецепторы клеточной поверхности, гликопротеины, витамины (например, рибофлавин) и антитела (например, полноразмерные антитела, фрагменты антител (например, Fv-фрагменты, одноцепочечные Fv-фрагменты (scFv), Fab'-фрагменты) или F(ab')2-фрагменты), однодоменные антитела, верблюжьи антитела и их фрагменты, человеческие антитела и их фрагменты, моноклональные антитела и полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела)). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент может представлять собой полипептид. Нацеливающий фрагмент может содержать весь полипептид (например, пептид или белок) или его фрагменты. Нацеливающий фрагмент обычно располагается на внешней поверхности наночастицы таким образом, что нацеливающий фрагмент был доступен для взаимодействия с мишенью, например, рецептором клеточной поверхности. В данной области техники известно и доступно множество различных нацеливающих фрагментов и способов, включая те, которые описаны, например, в Sapra et al., *Prog. Lipid Res.* 42(5):439-62, 2003 and Abra et al., *J. Liposome Res.* 12:1-3, 2002.

В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица (например, липосома) может содержать поверхностный слой гидрофильных полимерных цепей, таких как цепи полиэтиленгликоля

(ПЭГ) (см., например, Allen et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1237: 99-108, 1995; DeFrees et al., *Journal of the American Chemistry Society* 118: 6101-6104, 1996; Blume et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1149: 180-184,1993; Klibanov et al., *Journal of Liposome Research* 2: 321-334, 1992; патент США № 5013556; Zalipsky, *Bioconjugate Chemistry* 4: 296-299, 1993; Zalipsky, *FEBS Letters* 353: 71-74, 1994; Zalipsky, в *Stealth Liposomes* Chapter 9 (Lasic and Martin, Eds) CRC Press, Boca Raton Fla., 1995). В одном подходе нацеливающий фрагмент для нацеливания липидной наночастицы связан с полярной концевой группой липидов, образующих наночастицу. В другом подходе нацеливающий фрагмент прикрепляется к дистальным концам цепей ПЭГ, образующих гидрофильный полимерный слой (см., например, Klibanov et al., *Journal of Liposome Research* 2: 321-334, 1992; Kirpotin et al., *FEBS Letters* 388: 115-118, 1996).

Могут быть использованы стандартные способы связывания нацеливающего фрагмента или фрагментов. Например, можно использовать фосфатидилэтаноламин, который можно активировать для присоединения целевых групп, или дериватизированные липофильные соединения, такие как дериватизированный липидами блеомицин. Липосомы, нацеленные липосомы, могут быть сконструированы с использованием, например, липосом, которые включают белок А (см., например, Renneisen et al., *J. Bio. Chem.*, 265:16337-16342, 1990 и Leonetti et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 87:2448-2451, 1990). Другие примеры конъюгации антител раскрыты в патенте США № 6027726. Примеры нацеливающих фрагментов также могут включать другие полипептиды, которые специфичны для клеточных компонентов, включая антигены, связанные с новообразованиями или опухолями. Полипептиды, используемые в качестве нацеливающих фрагментов, могут быть присоединены к липосомам через ковалентные связи (см., например, Heath, Covalent Attachment of Proteins to Liposomes, 149 *Methods in Enzymology* 111-119 (Academic Press, Inc. 1987)). Другие способы нацеливания включают систему биотин-авидин.

В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица согласно раскрытию содержит нацеливающий фрагмент, который нацеливает липидную наночастицу на клетку, включая, но не ограничиваясь этим, гепатоциты, клетки толстой кишки, эпителиальные клетки, гемопоэтические клетки, эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, клетки легкого, остеоциты,

стволовые клетки, мезенхимальные клетки, нервные клетки, клетки сердца, адипоциты, гладкомышечные клетки сосудов, кардиомиоциты, клетки скелетных мышц, бета-клетки, клетки гипофиза, клетки синовиальной оболочки, клетки яичников, клетки яичка, фибробласты, В-клетки, Т-клетки, ретикулоциты, лейкоциты, гранулоциты и опухолевые клетки (включая первичные опухолевые клетки и метастатические опухолевые клетки). В конкретных вариантах осуществления нацеливающий фрагмент нацеливает липидную наночастицу на гепатоцит. В других вариантах осуществления нацеливающий фрагмент нацеливает липидную наночастицу на клетку толстой кишки. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий фрагмент нацеливает липидную наночастицу на клетку рака печени (например, клетку гепатоцеллюлярной карциномы) или клетку колоректального рака (например, первичную опухоль или метастазы).

***Липидные наночастицы***

В одном наборе вариантов осуществления предложены липидные наночастицы (LNP). В одном варианте осуществления липидная наночастица содержит липиды, включая ионизируемый липид, структурный липид, фосфолипид и одну или более мРНК. Каждую из LNP, описанных в данном документе, можно использовать в качестве состава для мРНК, описанной в данном документе. В одном варианте осуществления липидная наночастица содержит ионизируемый липид, структурный липид, фосфолипид, ПЭГ-модифицированный липид и одну или более мРНК. В некоторых вариантах осуществления LNP содержит ионизируемый липид, ПЭГ-модифицированный липид, стерин и фосфолипид. В некоторых вариантах осуществления LNP имеет мольное соотношение около 20-60% ионизируемого липида: около 5-25% фосфолипида: около 25-55% стерола; и около 0,5-15% ПЭГ-модифицированного липида. В некоторых вариантах осуществления LNP имеет мольное соотношение около 50% ионизируемого липида, около 1,5% ПЭГ-модифицированного липида, около 38,5% холестерина и около 10% фосфолипида. В некоторых вариантах осуществления LNP имеет мольное соотношение около 55% ионизируемого липида, около 2,5% ПЭГ-липида, около 32,5% холестерина и около 10% фосфолипида. В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой ионизируемый амино- или катионный липид, а нейтральный липид представляет собой фосфолипид, а стерин представляет собой холестерин. В некоторых вариантах осуществления LNP имеет мольное соотношение 50: 38,5: 10: 1,5

для ионизируемого липида: холестерина: DSPC (1,2-диоктадеканоил-sn-глицеро-3-фосфохолин): ПЭГ-DMG.

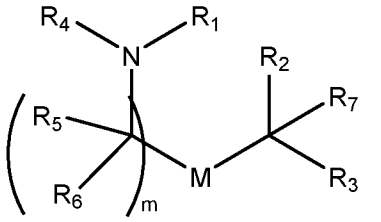
**a. Ионизируемый липид**

Данное раскрытие обеспечивает фармацевтические композиции с предпочтительными свойствами. Например, липиды, описанные в данном документе, (например, те, которые имеют любую из формул (I), (IA), (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId), (IIe), (III), (IV), (V) или (VI) могут быть преимущественно использованы в композициях липидных наночастиц для доставки терапевтических и/или профилактических агентов в клетки или органы млекопитающих. Например, липиды, описанные в данном документе, имеют небольшую иммуногенность или не имеют ее вообще. Например, описанные в данном документе липидные соединения обладают более низкой иммуногенностью по сравнению с эталонным липидом (например, MC3, KC2 или DLinDMA). Например, композиция, содержащая липид, раскрытый в данном документе, и терапевтический или профилактический агент, имеет повышенный терапевтический индекс по сравнению с соответствующей композицией, которая содержит эталонный липид (например, MC3, KC2 или DLinDMA) и тот же терапевтический или профилактический агент. В частности, данная заявка обеспечивает фармацевтические композиции, содержащие:

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую представляющий интерес полипептид; и

(b) агент доставки.

В некоторых вариантах осуществления агент доставки включает липидное соединение, имеющее формулу (I)




(I),

где

$R_1$ выбирают из группы, состоящей из $C_{5-30}$ алкила, $C_{5-20}$ алкенила, R*YR", YR", и R"M'R';

$R_2$ и $R_3$ независимо выбирают из группы, состоящей из H, $C_{1-14}$ алкила, $C_{2-14}$ алкенила, R*YR", YR", и R*OR", или $R_2$ и $R_3$, которые вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют гетероцикл или карбоцикл;

R4 выбирают из группы, состоящей из $C_{3-6}$ карбоцикла, $(CH_2)_nQ$, $(CH_2)_nCHQR$, CHQR, $CQ(R)_2$, и незамещенного $C_{16}$ алкила, где Q выбирают из карбоцикла, гетероцикла, OR, $O(CH_2)_nN(R)_2$, C(O)OR, OC(O)R, $CX_3$, $CX_2H$, $CXH_2$, CN, $N(R)_2$, $C(O)N(R)_2$, N(R)C(O)R, $N(R)S(O)_2R$, $N(R)C(O)N(R)_2$, $N(R)C(S)N(R)_2$, $N(R)R_8$, $O(CH_2)_nOR$, $N(R)C(=NR_9)N(R)_2$, $N(R)C(=CHR_9)N(R)_2$, $OC(O)N(R)_2$, N(R)C(O)OR, N(OR)C(O)R, $N(OR)S(O)_2R$, N(OR)C(O)OR, $N(OR)C(O)N(R)_2$, $N(OR)C(S)N(R)_2$, $N(OR)C(=NR_9)N(R)_2$, $N(OR)C(=CHR_9)N(R)_2$, $C(=NR_9)N(R)_2$, $C(=NR_9)R$, C(O)N(R)OR, и $C(R)N(R)_2C(O)OR$, и каждый n независимо выбирают из 1, 2, 3, 4 и 5;

каждый $R_5$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый $R_6$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

M и M′ независимо выбирают из C(O)O, OC(O), C(O)N(R′), N(R′)C(O), C(O), C(S), C(S)S, SC(S), CH(OH), P(O)(OR′)O, $S(O)_2$, SS, арильной группы и гетероарильной группы;

$R_7$ выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

$R_8$ выбирают из группы, состоящей из $C_{3-6}$ карбоцикла и гетероцикла;

$R_9$ выбирают из группы, состоящей из H, CN, $NO_2$, $C_{1-6}$ алкила, –OR, $-S(O)_2R$, $-S(O)_2N(R)_2$, $C_{2-6}$ алкенила, $C_{3-6}$ карбоцикла и гетероцикла;

каждый R независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый R′ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-18}$ алкила, $C_{2-18}$ алкенила, R*YR″, YR″ и H;

каждый R″ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{3-14}$ алкила, $C_{3-14}$ алкенила;

каждый R* независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-12}$ алкила, $C_{2-12}$ алкенила;

каждый Y независимо представляет собой $C_{3-6}$ карбоцикл;

каждый X независимо выбирают из группы, состоящей из F, Cl, Br и I; и m выбирают из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 и 13,

или их солей или стереоизомеров.

В некоторых вариантах осуществления поднабор соединений формулы (I) включает соединения, в которых

$R_1$ выбирают из группы, состоящей из $C_{5-20}$ алкила, $C_{5-20}$ алкенила, R*YR″, YR″, и R″M′R′;

$R_2$ и $R_3$ независимо выбирают из группы, состоящей из H, $C_{1-14}$ алкила, $C_{2-14}$ алкенила, R*YR", YR", и R*OR", или $R_2$ и $R_3$, которые вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют гетероцикл или карбоцикл;

$R_4$ выбирают из группы, состоящей из $C_{3-6}$ карбоцикла, $(CH_2)_nQ$, $(CH_2)_nCHQR$, CHQR, $CQ(R)_2$, и незамещенного $C_{1-6}$ алкила, где Q выбирают из карбоцикла, гетероцикла, OR, $O(CH_2)_nN(R)_2$, C(O)OR, OC(O)R, $CX_3$, $CX_2H$, $CXH_2$, CN, $N(R)_2$, $C(O)N(R)_2$, N(R)C(O)R, $N(R)S(O)_2R$, $N(R)C(O)N(R)_2$, $N(R)C(S)N(R)_2$, и $C(R)N(R)_2C(O)OR$, и каждый n независимо выбирают из 1, 2, 3, 4 и 5;

каждый $R_5$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый $R_6$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

M и M' независимо выбирают из C(O)O, OC(O), C(O)N(R'), N(R')C(O), C(O), C(S), C(S)S, SC(S), CH(OH), P(O)(OR')O, $S(O)_2$, арильной группы и гетероарильной группы;

$R_7$ выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый R независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый R' независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-18}$ алкила, $C_{2-18}$ алкенила, R*YR", YR" и H;

каждый R" независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{3-14}$ алкила, $C_{3-14}$ алкенила;

каждый R* независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-12}$ алкила, $C_{2-12}$ алкенила;

каждый Y независимо представляет собой $C_{3-6}$ карбоцикл;

каждый X независимо выбирают из группы, состоящей из F, Cl, Br и I; и m выбирают из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 и 13,

или их солей или стереоизомеров, где алкильные и алкенильные группы могут быть линейными или разветвленными.

В некоторых вариантах осуществления поднабор соединений формулы (I) включает соединения, в которых, если $R_4$ представляет собой $(CH_2)_nQ$, $(CH_2)_nCHQR$, CHQR, или $CQ(R)_2$, тогда (i) Q не является $N(R)_2$, если n равно 1, 2, 3, 4 или 5, или (ii) Q не является 5, 6 или 7-членным гетероциклоалкилом, если n равно 1 или 2.

В других вариантах осуществления другой поднабор соединений формулы (I) включает соединения, в которых

$R_1$ выбирают из группы, состоящей из $C_{530}$ алкила, $C_{520}$ алкенила, R*YR", YR", и R"M'R';

$R_2$ и $R_3$ независимо выбирают из группы, состоящей из H, $C_{114}$ алкила, $C_{214}$ алкенила, R*YR", YR", и R*OR", или $R_2$ и $R_3$, которые вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют гетероцикл или карбоцикл;

$R_4$ выбирают из группы, состоящей из $C_{36}$ карбоцикла, $(CH_2)_nQ$, $(CH_2)_nCHQR$, CHQR, $CQ(R)_2$, и незамещенного $C_{16}$ алкила, где Q выбирают из $C_{36}$ карбоцикла, 5-14-членного гетероарила, имеющего один или более гетероатомов, выбранных из N, O, и S, OR, $O(CH_2)_nN(R)_2$, C(O)OR, OC(O)R, $CX_3$, $CX_2H$, $CXH_2$, CN, $C(O)N(R)_2$, N(R)C(O)R, $N(R)S(O)_2R$, $N(R)C(O)N(R)_2$, $N(R)C(S)N(R)_2$, $CRN(R)_2C(O)OR$, $N(R)R_8$, $O(CH_2)_nOR$, $N(R)C(=NR_9)N(R)_2$, $N(R)C(=CHR_9)N(R)_2$, $OC(O)N(R)_2$, N(R)C(O)OR, N(OR)C(O)R, $N(OR)S(O)_2R$, N(OR)C(O)OR, $N(OR)C(O)N(R)_2$, $N(OR)C(S)N(R)_2$, $N(OR)C(=NR_9)N(R)_2$, $N(OR)C(=CHR_9)N(R)_2$, $C(=NR_9)N(R)_2$, $C(=NR_9)R$, C(O)N(R)OR, и 5-14-членного гетероциклоалкила, имеющего один или более гетероатомов, выбранных из N, O и S, который замещен одним или более заместителями, выбранными из оксо(= O), OH, амино и $C_{1-3}$ алкила, и каждый n независимо выбирают из 1, 2, 3, 4 и 5;

каждый $R_5$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый $R_6$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

M и M' независимо выбирают из C(O)O, OC(O), C(O)N(R'), N(R')C(O), C(O), C(S), C(S)S, SC(S), CH(OH), P(O)(OR')O, $S(O)_2$, SS, арильной группы и гетероарильной группы;

$R_7$ выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

$R_8$ выбирают из группы, состоящей из $C_{3-6}$ карбоцикла и гетероцикла;

$R_9$ выбирают из группы, состоящей из H, CN, $NO_2$, $C_{1-6}$ алкила, -OR, $-S(O)_2R$, $-S(O)_2N(R)_2$, $C_{2-6}$ алкенила, $C_{3-6}$ карбоцикла и гетероцикла;

каждый R независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый R' независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-18}$ алкила, $C_{2-18}$ алкенила, R*YR", YR" и H;

каждый R" независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{3-14}$ алкила, $C_{3-14}$ алкенила;

каждый R* независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-12}$ алкила, $C_{2-12}$ алкенила;

каждый Y независимо представляет собой $C_{3-6}$ карбоцикл;

каждый X независимо выбирают из группы, состоящей из F, Cl, Br и I; и

m выбирают из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 и 13,

или их солей или стереоизомеров.

В других вариантах осуществления другой поднабор соединений формулы (I) включает соединения, в которых

$R_1$ выбирают из группы, состоящей из $C_{530}$ алкила, $C_{520}$ алкенила, R*YR", YR", и R"M'R';

$R_2$ и $R_3$ независимо выбирают из группы, состоящей из H, $C_{114}$ алкила, $C_{214}$ алкенила, R*YR", YR", и R*OR", или $R_2$ и $R_3$, которые вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют гетероцикл или карбоцикл;

$R_4$ выбирают из группы, состоящей из $C_{36}$ карбоцикла, $(CH_2)_nQ$, $(CH_2)_nCHQR$, CHQR, $CQ(R)_2$, и незамещенного $C_{1-6}$ алкила, где Q выбирают из $C_{3-6}$ карбоцикла, 5–14- членного гетероарила, имеющего один или более гетероатомов, выбранных из N, O и S, -OR, $O(CH_2)_nN(R)_2$, C(O)OR, OC(O)R, $CX_3$, $CX_2H$, $CXH_2$, CN, $C(O)N(R)_2$, N(R)C(O)R, $N(R)S(O)_2R$, $N(R)C(O)N(R)_2$, $N(R)C(S)N(R)_2$, $CRN(R)_2C(O)OR$, и 5–14-членного гетероциклоалкила, имеющего один или более гетероатомов, выбранных из N, O и S, который замещен одним или более заместителями, выбранными из оксо( = O), OH, амино и $C_{1-3}$ алкила, и каждый n независимо выбирают из 1, 2, 3, 4 и 5;

каждый $R_5$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый $R_6$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

M и M' независимо выбирают из C(O)O, OC(O), C(O)N(R'), N(R')C(O), C(O), C(S), C(S)S, SC(S), CH(OH), P(O)(OR')O, $S(O)_2$, арильной группы и гетероарильной группы;

$R_7$ выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый R независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый R' независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-18}$ алкила, $C_{2-18}$ алкенила, R*YR", YR" и H;

каждый R" независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{3-14}$

алкила, $C_{3-14}$ алкенила;

каждый R* независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-12}$ алкила, $C_{2-12}$ алкенила;

каждый Y независимо представляет собой $C_{3-6}$ карбоцикл;

каждый X независимо выбирают из группы, состоящей из F, Cl, Br и I; и

m выбирают из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 и 13,

или их солей или стереоизомеров.

В еще одних других вариантах осуществления другой поднабор соединений формулы (I) включает соединения, в которых

$R_1$ выбирают из группы, состоящей из $C_{5-20}$ алкила, $C_{5-20}$ алкенила, R*YR″, YR″, и R″M′R′;

$R_2$ и $R_3$ независимо выбирают из группы, состоящей из H, $C_{1-14}$ алкила, $C_{2-14}$ алкенила, R*YR″, YR″, и R*OR″, или $R_2$ и $R_3$, которые вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют гетероцикл или карбоцикл;

$R_4$ выбирают из группы, состоящей из $C_{3-6}$ карбоцикла, $(CH_2)_nQ$, $(CH_2)_nCHQR$, CHQR, $CQ(R)_2$, и незамещенного $C_{1-6}$ алкила, где Q выбирают из $C_{3-6}$ карбоцикла, 5–14- членного гетероцикла, имеющего один или более гетероатомов, выбранных из N, O и S, OR, $O(CH_2)_nN(R)_2$, C(O)OR, OC(O)R, $CX_3$, $CX_2H$, $CXH_2$, CN, $C(O)N(R)_2$, N(R)C(O)R, $N(R)S(O)_2R$, $N(R)C(O)N(R)_2$, $N(R)C(S)N(R)_2$, $CRN(R)_2C(O)OR$, $N(R)R_8$, $O(CH_2)_nOR$, $N(R)C(=NR_9)N(R)_2$, $N(R)C(=CHR_9)N(R)_2$, $OC(O)N(R)_2$, N(R)C(O)OR, N(OR)C(O)R, $N(OR)S(O)_2R$, N(OR)C(O)OR, $N(OR)C(O)N(R)_2$, $N(OR)C(S)N(R)_2$, $N(OR)C(=NR_9)N(R)_2$, $N(OR)C(=CHR_9)N(R)_2$, $C(=NR_9)R$, C(O)N(R)OR, и $C(=NR_9)N(R)_2$, и каждый n независимо выбирают из 1, 2, 3, 4 и 5; и если Q представляет собой 5–14-членный гетероцикл и (i) $R_4$ представляет собой $(CH_2)_nQ$, в котором n равно 1 или 2, или (ii) $R_4$ представляет собой $(CH_2)_nCHQR$, в котором n равно 1, или (iii) $R_4$ представляет собой –CHQR и $CQ(R)_2$, тогда Q представляет собой или 5–14-членный гетероарил, или 8–14-членный гетероциклоалкил;

каждый $R_5$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый $R_6$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

M и M′ независимо выбирают из C(O)O, OC(O), C(O)N(R′), N(R′)C(O), C(O), C(S), C(S)S, SC(S), CH(OH), P(O)(OR′)O, $S(O)_2$, SS, арильной группы и гетероарильной группы;

$R_7$ выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила

и H;

$R_8$ выбирают из группы, состоящей из $C_{3-6}$ карбоцикла и гетероцикла;

$R_9$ выбирают из группы, состоящей из H, CN, $NO_2$, $C_{1-6}$ алкила, -OR, $-S(O)_2R$, $-S(O)_2N(R)_2$, $C_{2-6}$ алкенила, $C_{3-6}$ карбоцикла и гетероцикла;

каждый R независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый R' независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-18}$ алкила, $C_{2-18}$ алкенила, R*YR", YR" и H;

каждый R" независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{3-14}$ алкила, $C_{3-14}$ алкенила;

каждый R* независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-12}$ алкила, $C_{2-12}$ алкенила;

каждый Y независимо представляет собой $C_{3-6}$ карбоцикл;

каждый X независимо выбирают из группы, состоящей из F, Cl, Br и I; и

m выбирают из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 и 13,

или их солей или стереоизомеров.

В еще одних других вариантах осуществления другой поднабор соединений формулы (I) включает соединения, в которых

$R_1$ выбирают из группы, состоящей из $C_{5-20}$ алкила, $C_{5-20}$ алкенила, R*YR", YR", и R"M'R';

$R_2$ и $R_3$ независимо выбирают из группы, состоящей из H, $C_{1-14}$ алкила, $C_{2-14}$ алкенила, R*YR", YR", и R*OR", или $R_2$ и $R_3$, которые вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют гетероцикл или карбоцикл;

$R_4$ выбирают из группы, состоящей из $C_{3-6}$ карбоцикла, $(CH_2)_nQ$, $(CH_2)_nCHQR$, CHQR, $CQ(R)_2$, и незамещенного $C_{1-6}$ алкила, где Q выбирают из $C_{3-6}$ карбоцикла, 5-14- членного гетероцикла, имеющего один или более гетероатомов, выбранных из N, O и S, OR, $O(CH_2)_nN(R)_2$, C(O)OR, OC(O)R, $CX_3$, $CX_2H$, $CXH_2$, CN, $C(O)N(R)_2$, N(R)C(O)R, $N(R)S(O)_2R$, $N(R)C(O)N(R)_2$, $N(R)C(S)N(R)_2$, $CRN(R)_2C(O)OR$, и каждый n независимо выбирают из 1, 2, 3, 4 и 5; и если Q представляет собой 5-14-членный гетероцикл и (i) $R_4$ представляет собой $(CH_2)_nQ$, в котором n равно 1 или 2, или (ii) $R_4$ представляет собой $(CH_2)_nCHQR$, в котором n равно 1, или (iii) $R_4$ представляет собой CHQR, и $CQ(R)_2$, тогда Q представляет собой или 5-14-членный гетероарил, или 8-14-членный гетероциклоалкил;

каждый $R_5$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$

алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый $R_6$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

M и M′ независимо выбирают из C(O)O, OC(O), C(O)N(R′), N(R′)C(O), C(O), C(S), C(S)S, SC(S), CH(OH), P(O)(OR′)O, $S(O)_2$, арильной группы и гетероарильной группы;

$R_7$ выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый R независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый R′ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-18}$ алкила, $C_{2-18}$ алкенила, R*YR″, YR″ и H;

каждый R″ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{3-14}$ алкила, $C_{3-14}$ алкенила;

каждый R* независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-12}$ алкила, $C_{2-12}$ алкенила;

каждый Y независимо представляет собой $C_{3-6}$ карбоцикл;

каждый X независимо выбирают из группы, состоящей из F, Cl, Br и I; и

m выбирают из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 и 13,

или их солей или стереоизомеров.

В еще других вариантах осуществления другой поднабор соединений формулы (I) включает соединения, в которых

$R_1$ выбирают из группы, состоящей из $C_{5-30}$ алкила, $C_{5-20}$ алкенила, R*YR″, YR″, и R″M′R′;

$R_2$ и $R_3$ независимо выбирают из группы, состоящей из H, $C_{1-14}$ алкила, $C_{2-14}$ алкенила, R*YR″, YR″, и R*OR″, или $R_2$ и $R_3$, которые вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют гетероцикл или карбоцикл;

$R_4$ выбирают из группы, состоящей из $C_{3-6}$ карбоцикла, $(CH_2)_nQ$, $(CH_2)_nCHQR$, CHQR, $CQ(R)_2$, и незамещенного $C_{1-6}$ алкила, где Q выбирают из $C_{3-6}$ карбоцикла, 5–14-членного гетероарила, имеющего один или более гетероатомов, выбранных из N, O, и S, –OR, $O(CH_2)_nN(R)_2$, C(O)OR, OC(O)R, $CX_3$, $CX_2H$, $CXH_2$, CN, $C(O)N(R)_2$, N(R)C(O)R, $N(R)S(O)_2R$, $N(R)C(O)N(R)_2$, $N(R)C(S)N(R)_2$, $CRN(R)_2C(O)OR$, $N(R)R_8$, $O(CH_2)_nOR$, $N(R)C(=NR_9)N(R)_2$, $N(R)C(=CHR_9)N(R)_2$, $OC(O)N(R)_2$, N(R)C(O)OR, N(OR)C(O)R, $N(OR)S(O)_2R$, N(OR)C(O)OR, $N(OR)C(O)N(R)_2$, $N(OR)C(S)N(R)_2$, $N(OR)C(=NR_9)N(R)_2$, $N(OR)C(=CHR_9)N(R)_2$, $C(=NR_9)R$, C(O)N(R)OR, и $C(=NR_9)N(R)_2$, и каждый n независимо выбирают из 1, 2, 3, 4 и 5;

каждый $R_5$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый $R_6$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

M и M' независимо выбирают из C(O)O, OC(O), C(O)N(R'), N(R')C(O), C(O), C(S), C(S)S, SC(S), CH(OH), P(O)(OR')O, $S(O)_2$, SS, арильной группы и гетероарильной группы;

$R_7$ выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

$R_8$ выбирают из группы, состоящей из $C_{3-6}$ карбоцикла и гетероцикла;

$R_9$ выбирают из группы, состоящей из H, CN, $NO_2$, $C_{1-6}$ алкила, –OR, $-S(O)_2R$, $-S(O)_2N(R)_2$, $C_{2-6}$ алкенила, $C_{3-6}$ карбоцикла и гетероцикла;

каждый R независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый R' независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-18}$ алкила, $C_{2-18}$ алкенила, R*YR", YR" и H;

каждый R" независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{3-14}$ алкила, $C_{3-14}$ алкенила;

каждый R* независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-12}$ алкила, $C_{2-12}$ алкенила;

каждый Y независимо представляет собой $C_{3-6}$ карбоцикл;

каждый X независимо выбирают из группы, состоящей из F, Cl, Br и I; и

m выбирают из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 и 13,

или их солей или стереоизомеров.

В еще других вариантах осуществления другой поднабор соединений формулы (I) включает соединения, в которых

$R_1$ выбирают из группы, состоящей из $C_{5-20}$ алкила, $C_{5-20}$ алкенила, R*YR", YR", и R"M'R';

$R_2$ и $R_3$ независимо выбирают из группы, состоящей из H, $C_{1-14}$ алкила, $C_{2-14}$ алкенила, R*YR", YR", и R*OR", или $R_2$ и $R_3$, которые вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют гетероцикл или карбоцикл;

$R_4$ выбирают из группы, состоящей из $C_{3-6}$ карбоцикла, $(CH_2)_nQ$, $(CH_2)_nCHQR$, CHQR, $CQ(R)_2$, и незамещенного $C_{1-6}$ алкила, где Q выбирают из $C_{3-6}$ карбоцикла, 5–14-членного гетероарила, имеющего один или более гетероатомов, выбранных из N, O и S, –OR, $O(CH_2)_nN(R)_2$, C(O)OR, OC(O)R, $CX_3$, $CX_2H$, $CXH_2$, CN, $C(O)N(R)_2$,

$N(R)C(O)R$, $N(R)S(O)_2R$, $N(R)C(O)N(R)_2$, $N(R)C(S)N(R)_2$, $CRN(R)_2C(O)OR$, и каждый n независимо выбирают из 1, 2, 3, 4 и 5;

каждый $R_5$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый $R_6$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

M и M′ независимо выбирают из $C(O)O$, $OC(O)$, $C(O)N(R')$, $N(R')C(O)$, $C(O)$, $C(S)$, $C(S)S$, $SC(S)$, $CH(OH)$, $P(O)(OR')O$, $S(O)_2$, арильной группы и гетероарильной группы;

$R_7$ выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый R независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый R′ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-18}$ алкила, $C_{2-18}$ алкенила, R*YR″, YR″ и H;

каждый R″ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{3-14}$ алкила, $C_{3-14}$ алкенила;

каждый R* независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-12}$ алкила, $C_{2-12}$ алкенила;

каждый Y независимо представляет собой $C_{3-6}$ карбоцикл;

каждый X независимо выбирают из группы, состоящей из F, Cl, Br и I; и

m выбирают из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 и 13,

или их солей или стереоизомеров.

В еще одних других вариантах осуществления другой поднабор соединений формулы (I) включает соединения, в которых

$R_1$ выбирают из группы, состоящей из $C_{5-30}$ алкила, $C_{5-20}$ алкенила, R*YR″, YR″, и R″M′R′;

$R_2$ и $R_3$ независимо выбирают из группы, состоящей из H, $C_{2-14}$ алкила, $C_{2-14}$ алкенила, R*YR″, YR″, и R*OR″, или $R_2$ и $R_3$, которые вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют гетероцикл или карбоцикл;

$R_4$ представляют собой $(CH_2)_nQ$ или $(CH_2)_nCHQR$, где Q представляет собой $N(R)_2$, и n выбирают из 3, 4 и 5;

каждый $R_5$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый $R_6$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

M и M′ независимо выбирают из $C(O)O$, $OC(O)$, $C(O)N(R')$, $N(R')C(O)$, $C(O)$, $C(S)$, $C(S)S$, $SC(S)$, $CH(OH)$, $P(O)(OR')O$, $S(O)_2$,

SS, арильной группы и гетероарильной группы;

$R_7$ выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый R независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый R′ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-18}$ алкила, $C_{2-18}$ алкенила, R*YR″, YR″ и H;

каждый R″ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{3-14}$ алкила, $C_{3-14}$ алкенила;

каждый R* независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-12}$ алкила, $C_{1-12}$ алкенила;

каждый Y независимо представляет собой $C_{3-6}$ карбоцикл;

каждый X независимо выбирают из группы, состоящей из F, Cl, Br и I; и

m выбирают из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 и 13,

или их солей или стереоизомеров.

В еще одних других вариантах осуществления другой поднабор соединений формулы (I) включает соединения, в которых

$R_1$ выбирают из группы, состоящей из $C_{5-20}$ алкила, $C_{5-20}$ алкенила, R*YR″, YR″, и R″M′R′;

$R_2$ и $R_3$ независимо выбирают из группы, состоящей из H, $C_{2-14}$ алкила, $C_{2-14}$ алкенила, R*YR″, YR″, и R*OR″, или $R_2$ и $R_3$, которые вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют гетероцикл или карбоцикл;

$R_4$ представляют собой $(CH_2)_nQ$ или $(CH_2)_nCHQR$, где Q представляет собой $N(R)_2$, и n выбирают из 3, 4 и 5;

каждый $R_5$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый $R_6$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

M и M′ независимо выбирают из C(O)O, OC(O), C(O)N(R′), N(R′)C(O), C(O), C(S), C(S)S, SC(S), CH(OH), P(O)(OR′)O, $S(O)_2$, арильной группы и гетероарильной группы;

$R_7$ выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый R независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый R′ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-18}$ алкила, $C_{2-18}$ алкенила, R*YR″, YR″ и H;

каждый R″ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{3-14}$

алкила, $C_{3-14}$ алкенила;

каждый R* независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-12}$ алкила, $C_{1-12}$ алкенила;

каждый Y независимо представляет собой $C_{3-6}$ карбоцикл;

каждый X независимо выбирают из группы, состоящей из F, Cl, Br и I; и

m выбирают из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 и 13,

или их солей или стереоизомеров.

В еще других вариантах осуществления другой поднабор соединений формулы (I) включает соединения, в которых

$R_1$ выбирают из группы, состоящей из $C_{5-30}$ алкила, $C_{5-20}$ алкенила, R*YR″, YR″, и R″M′R′;

$R_2$ и $R_3$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-14}$ алкила, $C_{2-14}$ алкенила, R*YR″, YR″, и R*OR″, или $R_2$ и $R_3$, которые вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют гетероцикл или карбоцикл;

$R_4$ выбирают из группы, состоящей из $(CH_2)_nQ$, $(CH_2)_nCHQR$, CHQR, и $CQ(R)_2$, где Q представляет собой $N(R)_2$, и n выбирают из 1, 2, 3, 4 и 5;

каждый $R_5$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый $R_6$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

M и M′ независимо выбирают из C(O)O, OC(O), C(O)N(R′), N(R′)C(O), C(O), C(S), C(S)S, SC(S), CH(OH), P(O)(OR′)O, $S(O)_2$, SS, арильной группы и гетероарильной группы;

$R_7$ выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый R независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый R′ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-18}$ алкила, $C_{2-18}$ алкенила, R*YR″, YR″ и H;

каждый R″ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{3-14}$ алкила, $C_{3-14}$ алкенила;

каждый R* независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-12}$ алкила, $C_{1-12}$ алкенила;

каждый Y независимо представляет собой $C_{3-6}$ карбоцикл;

каждый X независимо выбирают из группы, состоящей из F, Cl, Br и I; и

m выбирают из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 и 13,

или их солей или стереоизомеров.

В еще других вариантах осуществления другой поднабор соединений формулы (I) включает соединения, в которых

$R_1$ выбирают из группы, состоящей из $C_{5-20}$ алкила, $C_{5-20}$ алкенила, R*YR", YR", и R"M'R';

$R_2$ и $R_3$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-14}$ алкила, $C_{2-14}$ алкенила, R*YR", YR", и R*OR", или $R_2$ и $R_3$, которые вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют гетероцикл или карбоцикл;

$R_4$ выбирают из группы, состоящей из $(CH_2)_nQ$, $(CH_2)_nCHQR$, CHQR, и $CQ(R)_2$, где Q представляет собой $N(R)_2$, и n выбирают из 1, 2, 3, 4 и 5;

каждый $R_5$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый $R_6$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

M и M' независимо выбирают из C(O)O, OC(O), C(O)N(R'), N(R')C(O), C(O), C(S), C(S)S, SC(S), CH(OH), P(O)(OR')O, $S(O)_2$, арильной группы и гетероарильной группы;

$R_7$ выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый R независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила, $C_{2-3}$ алкенила и H;

каждый R' независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-18}$ алкила, $C_{2-18}$ алкенила, R*YR", YR" и H;

каждый R" независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{3-14}$ алкила, $C_{3-14}$ алкенила;

каждый R* независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-12}$ алкила, $C_{1-12}$ алкенила;

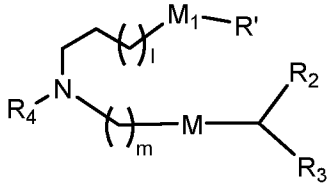
каждый Y независимо представляет собой $C_{3-6}$ карбоцикл;

каждый X независимо выбирают из группы, состоящей из F, Cl, Br и I; и

m выбирают из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 и 13,

или их солей или стереоизомеров.

В определенных вариантах осуществления поднабор соединений формулы (I) включает соединения формулы (IA):




(IA),

или их соль или стереоизомер, где l выбирают из 1, 2, 3, 4 и 5; m выбирают из 5, 6, 7, 8 и 9; $M_1$ представляет собой связь или M'; $R_4$ представляет собой незамещенный $C_{1-3}$ алкил или $((CH_2)_nQ$, в котором Q представляет собой OH, $NHC(S)N(R)_2$, $NHC(O)N(R)_2$, $N(R)C(O)R$, $N(R)S(O)_2R$, $N(R)R_8$, $NHC(=NR_9)N(R)_2$, $NHC(=CHR_9)N(R)_2$, $OC(O)N(R)_2$, $N(R)C(O)OR$, гетероарил или гетероциклоалкил; M и M' независимо выбирают из C(O)O, OC(O), C(O)N(R'), P(O)(OR')O, SS, арильной группы и гетероарильной группы; и

$R_2$ и $R_3$ независимо выбирают из группы, состоящей из H, $C_{1-14}$ алкила и $C_{2-14}$ алкенила.

В некоторых вариантах осуществления поднабор соединений формулы (I) включает соединения формулы (IA) или их соли или стереоизомеры,

где

l выбирают из 1, 2, 3, 4 и 5; m выбирают из 5, 6, 7, 8 и 9;

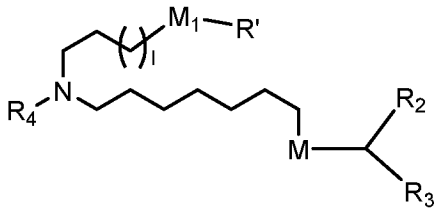
$M_1$ представляет собой связь или M';

$R_4$ представляет собой незамещенный $C_{1-3}$ алкил или $(CH_2)_nQ$, в котором Q представляет собой OH, $NHC(S)N(R)_2$, или $NHC(O)N(R)_2$;

M и M' независимо выбирают из C(O)O, OC(O), C(O)N(R'), P(O)(OR')O, арильной группы и гетероарильной группы; и

$R_2$ и $R_3$ независимо выбирают из группы, состоящей из H, $C_{1-14}$ алкила и $C_{2-14}$ алкенила.

В определенных вариантах осуществления поднабор соединений формулы (I) включает соединения формулы (II):




(II)

или их соль или стереоизомер, где l выбирают из 1, 2, 3, 4 и 5; $M_1$ представляет собой связь или M'; $R_4$ представляет собой незамещенный $C_{13}$ алкил, или $(CH_2)_nQ$, в котором n представляет собой 2, 3 или 4, и Q представляет собой OH, $NHC(S)N(R)_2$, $NHC(O)N(R)_2$, $N(R)C(O)R$, $N(R)S(O)_2R$, $N(R)R_8$, $NHC(=NR_9)N(R)_2$, $NHC(=CHR_9)N(R)_2$, $-OC(O)N(R)_2$, $N(R)C(O)OR$, гетероарил или гетероциклоалкил; M и M' независимо выбирают из C(O)O, OC(O), C(O)N(R'), P(O)(OR')O, SS, арильной группы и гетероарильной группы; и

$R_2$ и $R_3$ независимо выбирают из группы, состоящей из H, $C_{1-14}$

алкила и $C_{2-14}$ алкенила.

В некоторых вариантах осуществления поднабор соединений формулы (I) включает соединения формулы (II) или их соли или стереоизомеры, где

l выбирают из 1, 2, 3, 4 и 5;

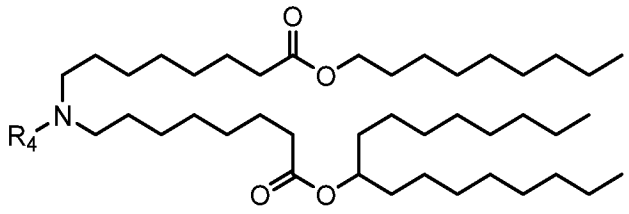
$M_1$ представляет собой связь или M';

$R_4$ представляет собой незамещенный $C_{1-3}$ алкил или $(CH_2)_nQ$, в котором n равно 2, 3, или 4, и Q представляет собой OH, $NHC(S)N(R)_2$, или $NHC(O)N(R)_2$;

M и M' независимо выбирают из C(O)O, OC(O), C(O)N(R'), P(O)(OR')O, арильной группы и гетероарильной группы; и

$R_2$ и $R_3$ независимо выбирают из группы, состоящей из H, $C_{1-14}$ алкила и $C_{2-14}$ алкенила.

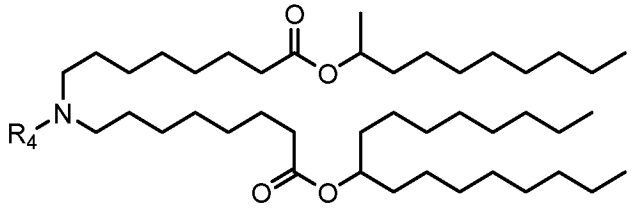
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) имеет формулу (IIa),



(IIa),

или его соль, где $R_4$ является таким, как описано выше.

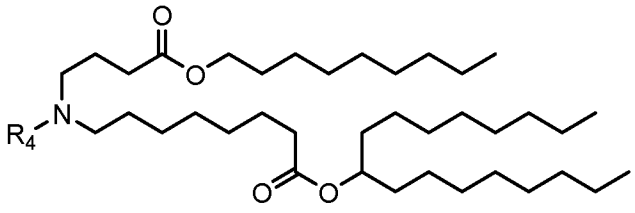
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) имеет формулу (IIb),



(IIb),

или его соль, где $R_4$ является таким, как описано выше.

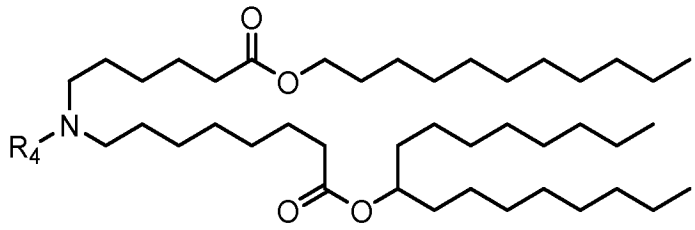
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) имеет формулу (IIc),



(IIc),

или его соль, где $R_4$ является таким, как описано выше.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) имеет формулу (IIe):



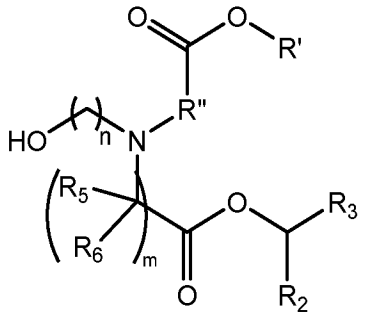
(IIe),

или его соль, где $R_4$ является таким, как описано выше.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (IIa), (IIb), (IIc) или (IIe) содержит $R_4$, который выбирают из $(CH_2)_nQ$ и $(CH_2)_nCHQR$, где Q, R и n являются такими, как определено выше.

В некоторых вариантах Q выбирают из группы, состоящей из OR, OH, $O(CH_2)_nN(R)_2$, OC(O)R, $CX_3$, CN, N(R)C(O)R, N(H)C(O)R, $N(R)S(O)_2R$, $N(H)S(O)_2R$, $N(R)C(O)N(R)_2$, $N(H)C(O)N(R)_2$, N(H)C(O)N(H)(R), $N(R)C(S)N(R)_2$, $N(H)C(S)N(R)_2$, N(H)C(S)N(H)(R), и гетероцикла, где R является таким, как определено выше. В некоторых аспектах n равно 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления Q представляет собой OH, $NHC(S)N(R)_2$, или $NHC(O)N(R)_2$.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) имеет формулу (IId),



(IId),

или его соль, причем $R_2$ и $R_3$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{5-14}$ алкила и $C_{5-14}$ алкенила, n выбирают из 2, 3 и 4, и R', R'', $R_5$, $R_6$ и m являются такими, как определено выше.

В некоторых аспектах соединения формулы (IId), $R_2$ представляет собой $C_8$ алкил. В некоторых аспектах соединения формулы (IId), $R_3$ представляет собой $C_5C_9$ алкил. В некоторых аспектах соединения формулы (IId), m равно 5, 7 или 9. В некоторых аспектах соединения формулы (IId) каждый $R_5$ представляет собой H. В некоторых аспектах соединения формулы (IId) каждый $R_6$ представляет собой H.

В другом аспекте данная заявка обеспечивает липидную композицию (например, липидную наночастицу (LNP)), содержащую:

(1) соединение, имеющее формулу (I); (2) необязательно вспомогательный липид (например, фосфолипид); (3) необязательно структурный липид (например, стерин); и (4) необязательно липидный конъюгат (например, ПЭГ-липид). В иллюстративных вариантах осуществления липидная композиция (например, LNP) дополнительно содержит полинуклеотид, кодирующий представляющий интерес полипептид, например, инкапсулированный в ней полинуклеотид.

Используемый в данном документе термин «алкил» или «алкильная группа» означает линейный или разветвленный насыщенный углеводород, содержащий один или более атомов углерода (например, один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать, двадцать или более атомов углерода).

Обозначение «$C_{1-14}$ алкил» означает линейный или разветвленный насыщенный углеводород, содержащий 114 атомов углерода. Алкильная группа может быть необязательно замещенной.

Используемый в данном документе термин «алкенил» или «алкенильная группа» означает линейный или разветвленный углеводород, содержащий два или более атомов углерода (например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать, двадцать или более атомов углерода) и по меньшей мере одну двойную связь.

Обозначение «$C_{2-14}$ алкенил» означает линейный или разветвленный углеводород, содержащий 214 атомов углерода и по меньшей мере одну двойную связь. Алкенильная группа может содержать одну, две, три, четыре или более двойных связей. Например, $C_{18}$ алкенил может содержать одну или более двойных связей. $C_{18}$ алкенильная группа, содержащая две двойные связи, может представлять собой линолеильную группу. Алкенильная группа может быть необязательно замещенной.

Используемый в данном документе термин «карбоцикл» или «карбоциклическая группа» означает моно- или полициклическую систему, содержащую одно или более колец атомов углерода. Кольца могут состоять из трех-, четырех-, пяти-, шести-, семи-, восьми-, девяти-, десяти-, одиннадцати-, двенадцати-, тринадцати-, четырнадцати- или пятнадцатичленных колец.

Обозначение «$C_{3-6}$ карбоцикл» означает карбоцикл, содержащий

одно кольцо с 3–6 атомами углерода. Карбоциклы могут содержать одну или более двойных связей и могут быть ароматическими (например, арильные группы). Примеры карбоциклов включают циклопропильную, циклопентильную, циклогексильную, фенильную, нафтильную и 1,2дигидронафтильную группы. Карбоциклы могут быть необязательно замещены.

Используемый в данном документе термин «гетероцикл» или «гетероциклическая группа» означает моно- или полициклическую систему, содержащую одно или более колец, где по меньшей мере одно кольцо содержит по меньшей мере один гетероатом. Гетероатомы могут представлять собой, например, атомы азота, кислорода или серы. Кольца могут представлять собой трех-, четырех-, пяти-, шести-, семи-, восьми-, девяти-, десяти-, одиннадцати- или двенадцатичленные кольца. Гетероциклы могут содержать одну или более двойных связей и могут быть ароматическими (например, гетероарильные группы). Примеры гетероциклов включают имидазолильную, имидазолидинильную, оксазолильную, оксазолидинильную, тиазолильную, тиазолидинильную, пиразолидинильную, пиразолильную, изоксазолидинильную, изоксазолильную, изотиазолидинильную, изотиазолильную, морфолинильную, пирролильную, пирролидильную, фурильную, тиофенильную, пиридинильную, пиперидинильную, хинолильную и изохинолильную группы. Гетероциклы могут быть необязательно замещены.

Используемый в данном документе термин «биоразлагаемая группа» представляет собой группу, которая может способствовать более быстрому метаболизму липида у субъекта. Биоразлагаемая группа может представлять собой, но не ограничиваются ими, C(O)O, OC(O), C(O)N(R’), N(R’)C(O), C(O), C(S), C(S)S, SC(S), CH(OH), P(O)(OR’)O, $S(O)_2$, арильную группу и гетероарильную группу.

Используемый в данном документе термин «арильная группа» представляет собой карбоциклическую группу, содержащую одно или более ароматических колец. Примеры арильных групп включают фенильные и нафтильные группы.

Используемый в данном документе термин «гетероарильная группа» представляет собой гетероциклическую группу, содержащую одно или более ароматических колец. Примеры гетероарильных групп включают пирролил, фурил, тиофенил, имидазолил, оксазолил и тиазолил. Как арильная, так и гетероарильная группы могут быть

необязательно замещены. Например, M и M′ могут быть выбраны из неограничивающей группы, состоящей из необязательно замещенного фенила, оксазола и тиазола. В приведенных в данном документе формулах M и M′ могут быть независимо выбраны из приведенного выше перечня биоразлагаемых групп.

Алкильные, алкенильные и циклические (например, карбоциклильные и гетероциклильные) группы могут быть необязательно замещены, если не указано иное. Необязательные заместители могут быть выбраны из группы, состоящей из, но не ограничиваясь этим, атома галогена (например, хлоридной, бромидной, фторидной или йодидной группы), карбоновой кислоты (например, C(O)OH), спирта (например, гидроксила, OH), сложного эфира (например, C(O)OR или OC(O)R), альдегида (например, C(O)H), карбонила (например, C(O)R, альтернативно представленного C=O), ацилгалогенида (например, C(O)X, в которой X представляет собой галогенид, выбранный из бромида, фторида, хлорида и йодида), карбоната (например, OC(O)OR), алкокси (например, OR), ацеталя (например, $C(OR)_2R''''$, в которой каждый OR представляет собой алкоксигруппы, которые могут быть одинаковыми или разными, и R"" представляет собой алкильную или алкенильную группу), фосфат (например, $P(O)_4^3$), тиол (например, SH), сульфоксид (например, S(O)R), сульфиновую кислоту (например, S(O)OH), сульфоновую кислоту (например, $S(O)_2OH$), тиал (например, C(S)H), сульфат (например, $S(O)_4^2$), сульфонил (например, $S(O)_2$), амид (например, $C(O)NR_2$, или N(R)C(O)R), азидо (например, $N_3$), нитро (например, $NO_2$), циано (например, CN), изоциано (например, NC), ацилокси (например, OC(O)R), амино (например, $NR_2$, NRH, или $NH_2$), карбамоил (например, $OC(O)NR_2$, OC(O)NRH, или $OC(O)NH_2$), сульфонамид (например, $S(O)_2NR_2$, $S(O)_2NRH$, $S(O)_2NH_2$, $N(R)S(O)_2R$, $N(H)S(O)_2R$, $N(R)S(O)_2H$, или $N(H)S(O)_2H$), алкильную группу, алкенильную группу и циклильную (например, карбоциклильную или гетероциклильную) группу.

В любом из предшествующих R представляет собой алкильную или алкенильную группу, как определено в данном документе. В некоторых вариантах осуществления сами группы заместителей могут быть дополнительно замещены, например, одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью или шестью заместителями, как определено в данном документе. Например, $C_{1-6}$ алкильная группа может быть дополнительно замещена одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью или шестью заместителями, как описано в данном документе.

Соединения любой из формул (I), (IA), (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId) и (IIe) включают один или более следующих признаков, когда это применимо.

В некоторых вариантах осуществления $R_4$ выбирают из группы, состоящей из $C_{3-6}$ карбоцикла, $(CH_2)_nQ$, $(CH_2)_nCHQR$, $CHQR$, и $CQ(R)_2$, где Q выбирают из $C_{3-6}$ карбоцикла, 5–14–членного ароматического или неароматического гетероцикла, имеющего один или более гетероатомов, выбранных из N, O, S и P, OR, $O(CH_2)_nN(R)_2$, $C(O)OR$, $OC(O)R$, $CX_3$, $CX_2H$, $CXH_2$, CN, $N(R)_2$, $C(O)N(R)_2$, $N(R)C(O)R$, $N(R)S(O)_2R$, $N(R)C(O)N(R)_2$, $N(R)C(S)N(R)_2$, и $C(R)N(R)_2C(O)OR$, и каждый n независимо выбирают из 1, 2, 3, 4 и 5.

В другом варианте осуществления $R_4$ выбирают из группы, состоящей из $C_{36}$ карбоцикла, $(CH_2)_nQ$, $(CH_2)_nCHQR$, $CHQR$, и $CQ(R)_2$, где Q выбирают из $C_{3-6}$ карбоцикла, 5–14–членного гетероарила, имеющего один или более гетероатомов, выбранных из N, O, и S, OR, $O(CH_2)_nN(R)_2$, $C(O)OR$, $OC(O)R$, $CX_3$, $CX_2H$, $CXH_2$, CN, $C(O)N(R)_2$, $N(R)C(O)R$, $N(R)S(O)_2R$, $N(R)C(O)N(R)_2$, $N(R)C(S)N(R)_2$, $C(R)N(R)_2C(O)OR$, и 5–14–членного гетероциклоалкила, имеющего один или более гетероатомов, выбранных из N, O и S, который замещен одним или более заместителями, выбранными из оксо (= O), OH, амино и $C_{1-3}$ алкила, и каждый n независимо выбирают из 1, 2, 3, 4 и 5.

В другом варианте осуществления $R_4$ выбирают из группы, состоящей из $C_{3-6}$ карбоцикла, $(CH_2)_nQ$, $(CH_2)_nCHQR$, $CHQR$, и $CQ(R)_2$, где Q выбирают из $C_{3-6}$ карбоцикла, 5–14–членного гетероцикла, имеющего один или более гетероатомов, выбранных из N, O и S, OR, $O(CH_2)_nN(R)_2$, $C(O)OR$, $OC(O)R$, $CX_3$, $CX_2H$, $CXH_2$, CN, $C(O)N(R)_2$, $N(R)C(O)R$, $N(R)S(O)_2R$, $N(R)C(O)N(R)_2$, $N(R)C(S)N(R)_2$, $C(R)N(R)_2C(O)OR$, и каждый n независимо выбирают из 1, 2, 3, 4, и 5; и если Q представляет собой 5–14–членный гетероцикл и (i) $R_4$ представляет собой $(CH_2)_nQ$ в которой n равно 1 или 2, или (ii) $R_4$ представляет собой $(CH_2)_nCHQR$, в которой n равно 1, или (iii) $R_4$ представляет собой $CHQR$, и $CQ(R)_2$, тогда Q представляет собой 5–14–членный гетероарил или 8–14–членный гетероциклоалкил.

В другом варианте осуществления $R_4$ выбирают из группы, состоящей из $C_{3-6}$ карбоцикла, $(CH_2)_nQ$, $(CH_2)_nCHQR$, $CHQR$, и $CQ(R)_2$, где Q выбирают из $C_{3-6}$ карбоцикла, 5–14–членного гетероарила, имеющего один или более гетероатомов, выбранных из N, O и S, OR, $O(CH_2)_nN(R)_2$, $C(O)OR$, $OC(O)R$, $CX_3$, $CX_2H$, $CXH_2$, CN, $C(O)N(R)_2$, $N(R)C(O)R$, $N(R)S(O)_2R$, $N(R)C(O)N(R)_2$, $N(R)C(S)N(R)_2$,

$C(R)N(R)_2C(O)OR$, и каждый n независимо выбирают из 1, 2, 3, 4 и 5.

В другом варианте осуществления $R_4$ представляет собой незамещенный $C_{1-4}$ алкил, например, незамещенный метил.

В определенных вариантах осуществления раскрытие обеспечивает соединение, имеющее формулу (I), где $R_4$ представляет собой $(CH_2)_nQ$ или $(CH_2)_nCHQR$, где Q представляет собой $N(R)_2$, и n выбирают из 3, 4 и 5.

В некоторых вариантах осуществления раскрытие обеспечивает соединение, имеющее формулу (I), где $R_4$ выбирают из группы, состоящей из $(CH_2)_nQ$, $(CH_2)_nCHQR$, CHQR, и $CQ(R)_2$, где Q представляет собой $-N(R)_2$, и n выбирают из 1, 2, 3, 4 и 5.

В некоторых вариантах осуществления раскрытие обеспечивает соединение, имеющее формулу (I), где $R_2$ и $R_3$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{2\text{-}14}$ алкила, $C_{2\text{-}14}$ алкенила, R*YR", YR", и R*OR", или $R_2$ и $R_3$, которые вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют гетероцикл или карбоцикл, и $R_4$ представляет собой $(CH_2)_nQ$ или $(CH_2)_nCHQR$, где Q представляет собой $N(R)_2$, и n выбирают из 3, 4 и 5.

В определенных вариантах осуществления $R_2$ и $R_3$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{2\text{-}14}$ алкила, $C_{2\text{-}14}$ алкенила, R*YR", YR", и $-$R*OR", или $R_2$ и $R_3$, которые вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют гетероцикл или карбоцикл.

В некоторых вариантах осуществления $R_1$ выбирают из группы, состоящей из $C_{5\text{-}20}$ алкила и $C_{5\text{-}20}$ алкенила.

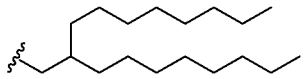
В других вариантах осуществления $R_1$ выбирают из группы, состоящей из $-$R*YR", YR" и R"M'R'.

В определенных вариантах осуществления $R_1$ выбирают из R*YR" и YR". В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой циклопропильную группу. В некоторых вариантах осуществления R* представляет собой $C_8$ алкил или $C_8$ алкенил. В определенных вариантах осуществления R" представляет собой $C_{3\text{-}12}$ алкил. Например, R" может представлять собой $C_3$ алкил. Например, R" может представлять собой $C_{4\text{-}8}$ алкил (например, $C_4$, $C_5$, $C_6$, $C_7$ или $C_8$ алкил).

В некоторых вариантах осуществления $R_1$ представляет собой $C_{5\text{-}20}$ алкил. В некоторых вариантах осуществления $R_1$ представляет собой $C_6$ алкил. В некоторых вариантах осуществления $R_1$ представляет собой $C_8$ алкил. В некоторых вариантах осуществления $R_1$ представляет собой $C_9$ алкил. В некоторых вариантах

осуществления $R_1$ представляет собой $C_{14}$ алкил. В некоторых вариантах осуществления $R_1$ представляет собой $C_{18}$ алкил.

В некоторых вариантах осуществления $R_1$ представляет собой $C_{5-20}$ алкенил. В некоторых вариантах осуществления $R_1$ представляет собой $C_{18}$ алкенил. В некоторых вариантах осуществления $R_1$ представляет собой линолеил.

В некоторых вариантах осуществления $R_1$ является разветвленным (например, декан-2-ил, ундекан-3-ил, додекан-4-ил, тридекан-5-ил, тетрадекан-6-ил, 2-метилундекан-3-ил, 2-метилдекан-2-ил, 3-метилундекан-3-ил, 4-метилдодекан-4-ил или гептадека-9-ил). В определенных вариантах осуществления $R_1$ представляет собой  .

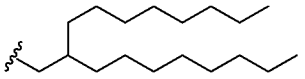
В определенных вариантах осуществления $R_1$ представляет собой незамещенный $C_{5-20}$ алкил или $C_{5-20}$ алкенил. В некоторых вариантах осуществления R′ представляет собой замещенный $C_{5-20}$ алкил или $C_{5-20}$ алкенил (например, замещенный $C_{3-6}$ карбоцикл, такой как 1-циклопропилнонил).

В других вариантах осуществления $R_1$ представляет собой R″M′R′.

В некоторых вариантах осуществления R′ выбирают из R*YR″ и YR″. В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой $C_{3-8}$ циклоалкил. В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой $C_{6-10}$ арил. В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой циклопропильную группу. В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой циклогексильную группу. В определенных вариантах осуществления R* представляет собой $C_1$ алкил.

В некоторых вариантах осуществления R″ выбирают из группы, состоящей из $C_{3-12}$ алкила и $C_{3-12}$ алкенила. В некоторых вариантах осуществления R″, смежный с Y, представляет собой $C_1$ алкил. В некоторых вариантах осуществления R″, смежный с Y, представляет собой $C_{4-9}$ алкил (например, $C_4$, $C_5$, $C_6$, $C_7$ или $C_8$ или $C_9$ алкил).

В некоторых вариантах осуществления R′ выбирают из $C_4$ алкила и $C_4$ алкенила. В определенных вариантах осуществления R′ выбирают из $C_5$ алкила и $C_5$ алкенила. В некоторых вариантах осуществления R′ выбирают из $C_6$ алкила и $C_6$ алкенила. В некоторых вариантах осуществления R′ выбирают из $C_7$ алкила и $C_7$ алкенила. В некоторых вариантах осуществления R′ выбирают из $C_9$ алкила и $C_9$ алкенила.

В других вариантах осуществления R′ выбирают из $C_{11}$ алкила и $C_{11}$ алкенила. В других вариантах осуществления R′ выбирают из $C_{12}$ алкила, $C_{12}$ алкенила, $C_{13}$ алкила, $C_{13}$ алкенила, $C_{14}$ алкила, $C_{14}$ алкенила, $C_{15}$ алкила, $C_{15}$ алкенила, $C_{16}$ алкила, $C_{16}$ алкенила, $C_{17}$ алкила, $C_{17}$ алкенила, $C_{18}$ алкила и $C_{18}$ алкенила. В некоторых вариантах осуществления R′ является разветвленным (например, декан-2-ил, ундекан-3-ил, додекан-4-ил, тридекан-5-ил, тетрадекан-6-ил, 2-метилундекан-3-ил, 2 -метилдекан-2-ил, 3-метилундекан-3-ил, 4-метилдодекан-4-ил или гептадека-9-ил). В определенных вариантах осуществления R′ представляет собой  .

В определенных вариантах осуществления R′ является незамещенным $C_{1-18}$ алкилом. В некоторых вариантах осуществления R′ представляет собой замещенный $C_{1-18}$ алкил (например, $C_{1-15}$ алкил, замещенный $C_{3-6}$ карбоциклом, таким как 1-циклопропилнонил).

В некоторых вариантах осуществления R″ выбирают из группы, состоящей из $C_{3-14}$ алкила и $C_{3-14}$ алкенила. В некоторых вариантах осуществления R″ представляет собой $C_3$ алкил, $C_4$ алкил, $C_5$ алкил, $C_6$ алкил, $C_7$ алкил или $C_8$ алкил. В некоторых вариантах осуществления R″ представляет собой $C_9$ алкил, $C_{10}$ алкил, $C_{11}$ алкил, $C_{12}$ алкил, $C_{13}$ алкил или $C_{14}$ алкил.

В некоторых вариантах осуществления M′ представляет собой C(O)O. В некоторых вариантах осуществления M′ представляет собой OC(O).

В других вариантах осуществления M′ представляет собой арильную группу или гетероарильную группу. Например, M′ может быть выбран из группы, состоящей из фенила, оксазола и тиазола.

В некоторых вариантах осуществления M представляет собой C(O)O. В некоторых вариантах осуществления M представляет собой OC(O). В некоторых вариантах M представляет собой C(O)N(R′). В некоторых вариантах M представляет собой P(O)(OR′)O.

В других вариантах осуществления M представляет собой арильную группу или гетероарильную группу. Например, M может быть выбран из группы, состоящей из фенила, оксазола и тиазола.

В некоторых вариантах осуществления M является таким же, как M′. В других вариантах осуществления M отличается от M′.

В некоторых вариантах осуществления каждый $R_5$ представляет

собой H. В некоторых таких вариантах осуществления каждый $R_6$ также представляет собой H.

В некоторых вариантах осуществления $R_7$ представляет собой H. В других вариантах осуществления $R_7$ представляет собой $C_{1-3}$ алкил (например, метил, этил, пропил или изопропил).

В некоторых вариантах осуществления $R_2$ и $R_3$ независимо представляют собой $C_{5-14}$ алкил или $C_{5-14}$ алкенил.

В некоторых вариантах осуществления $R_2$ и $R_3$ являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления $R_2$ и $R_3$ представляют собой $C_8$ алкил. В некоторых вариантах осуществления $R_2$ и $R_3$ представляют собой $C_2$ алкил. В других вариантах осуществления $R_2$ и $R_3$ представляют собой $C_3$ алкил. В некоторых вариантах осуществления $R_2$ и $R_3$ представляют собой $C_4$ алкил. В определенных вариантах осуществления $R_2$ и $R_3$ представляют собой $C_5$ алкил. В других вариантах осуществления $R_2$ и $R_3$ представляют собой $C_6$ алкил. В некоторых вариантах осуществления $R_2$ и $R_3$ представляют собой $C_7$ алкил.

В других вариантах осуществления $R_2$ и $R_3$ являются разными. В некоторых вариантах осуществления $R_2$ представляет собой $C_8$ алкил. В некоторых вариантах осуществления $R_3$ представляет собой $C_{1-7}$ (например, $C_1$, $C_2$, $C_3$, $C_4$, $C_5$, $C_6$, или $C_7$ алкил) или $C_9$ алкил.

В некоторых вариантах осуществления $R_7$ и $R_3$ представляют собой H.

В определенных вариантах осуществления $R_2$ представляет собой H.

В некоторых вариантах осуществления m равно 5, 7 или 9.

В некоторых вариантах осуществления $R_4$ выбирают из $(CH_2)_nQ$ и $(CH_2)_nCHQR$.

В некоторых вариантах Q выбирают из группы, состоящей из OR, OH, $O(CH_2)_nN(R)_2$, $OC(O)R$, $CX_3$, CN, $N(R)C(O)R$, $N(H)C(O)R$, $N(R)S(O)_2R$, $N(H)S(O)_2R$, $N(R)C(O)N(R)_2$, $N(H)C(O)N(R)_2$, $N(H)C(O)N(H)(R)$, $N(R)C(S)N(R)_2$, $N(H)C(S)N(R)_2$, $N(H)C(S)N(H)(R)$, $C(R)N(R)_2C(O)OR$, карбоцикла и гетероцикла.

В некоторых вариантах Q представляет собой OH.

В некоторых вариантах осуществления Q представляет собой замещенный или незамещенный 5–10-членный гетероарил, например, Q представляет собой имидазол, пиримидин, пурин, 2-амино-1,9-дигидро-6*H*-пурин-6-он-9 ил (или гуанин-9-ил), аденин-9-ил, цитозин-1-ил или урацил-1-ил. В некоторых вариантах осуществления Q представляет собой замещенный 5–14-членный

гетероциклоалкил, например, замещенный одним или более заместителями, выбранными из оксо (= O), OH, амино и $C_{1-3}$ алкила. Например, Q представляет собой 4-метилпиперазинил, 4-(4-метоксибензил)пиперазинил или изоиндолин-2-ил-1,3-дион.

В определенных вариантах осуществления Q представляет собой незамещенный или замещенный $C_{6-10}$ арил (такой как фенил) или $C_{3-6}$ циклоалкил.

В некоторых вариантах осуществления n равно 1. В других вариантах осуществления n равно 2. В дополнительных вариантах осуществления n равно 3. В некоторых других вариантах осуществления n равно 4. Например, $R_4$ может представлять собой $(CH_2)_2OH$. Например, $R_4$ может представлять собой $(CH_2)_3OH$. Например, $R_4$ может представлять собой $(CH_2)_4OH$. Например, $R_4$ может представлять собой бензил. Например, $R_4$ может представлять собой 4-метоксибензил.

В некоторых вариантах осуществления $R_4$ представляет собой $C_{3-6}$ карбоцикл. В некоторых вариантах осуществления $R_4$ представляет собой $C_{3-6}$ циклоалкил. Например, $R_4$ может быть циклогексилом, необязательно замещенным, например, OH, галогеном, $C_{1-6}$ алкилом и т. д. Например, $R_4$ может представлять собой 2-гидроксициклогексил.

В некоторых вариантах осуществления R представляет собой H.

В некоторых вариантах осуществления R представляет собой незамещенный $C_{1-3}$ алкил или незамещенный $C_{2-3}$ алкенил. Например, $R_4$ может представлять собой $CH_2CH(OH)CH_3$ или $CH_2CH(OH)CH_2CH_3$.

В некоторых вариантах осуществления R представляет собой замещенный $C_{1-3}$ алкил, например, $CH_2OH$. Например, $R_4$ может представлять собой $CH_2CH(OH)CH_2OH$.

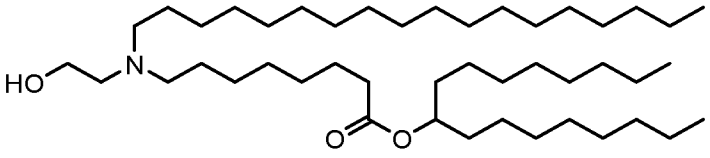
В некоторых вариантах осуществления $R_2$ и $R_3$ вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют гетероцикл или карбоцикл. В некоторых вариантах осуществления $R_2$ и $R_3$ вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют 5-14-членный ароматический или неароматический гетероцикл, имеющий один или более гетероатомов, выбранных из N, O, S и P. В некоторых вариантах осуществления $R_2$ и $R_3$ вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют необязательно замещенный $C_{3-20}$ карбоцикл (например, $C_{3-18}$ карбоцикл, $C_{3-15}$ карбоцикл, $C_{3-12}$ карбоцикл или $C_{3-10}$ карбоцикл), или ароматический, или неароматический. В некоторых вариантах осуществления $R_2$ и $R_3$ вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют $C_{36}$ карбоцикл. В других вариантах

осуществления $R_2$ и $R_3$ вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют $C_6$ карбоцикл, такой как циклогексильная или фенильная группа. В некоторых вариантах осуществления гетероцикл или $C_{3-6}$ карбоцикл замещают одной или более алкильными группами (например, при одном и том же атоме кольца или при соседних или несмежных атомах кольца). Например, $R_2$ и $R_3$ вместе с атомом, к которому они присоединены, могут образовывать циклогексильную или фенильную группу, имеющую одну или более $C_5$ алкильных замен. В определенных вариантах осуществления гетероцикл или $C_{3-6}$ карбоцикл, образованный $R_2$ и $R_3$, замещают карбоциклическими группами. Например, $R_2$ и $R_3$ вместе с атомом, к которому они присоединены, могут образовывать циклогексильную или фенильную группу, которая замещена циклогексилом. В некоторых вариантах осуществления $R_2$ и $R_3$ вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют карбоцикл $C_{7-15}$, такой как циклогептильная, циклопентадеканильная или нафтильная группа.

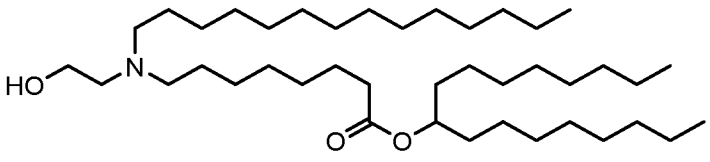
В некоторых вариантах осуществления $R_4$ выбирают из $(CH_2)_nQ$ и $(CH_2)_nCHQR$. В некоторых вариантах Q выбирают из группы, состоящей из OR, OH, $O(CH_2)_nN(R)_2$, OC(O)R, $CX_3$, CN, N(R)C(O)R, N(H)C(O)R, $N(R)S(O)_2R$, $N(H)S(O)_2R$, $N(R)C(O)N(R)_2$, $N(H)C(O)N(R)_2$, N(H)C(O)N(H)(R), $N(R)C(S)N(R)_2$, $N(H)C(S)N(R)_2$, N(H)C(S)N(H)(R), и гетероцикла. В других вариантах осуществления Q выбирают из группы, состоящей из имидазола, пиримидина и пурина.

В некоторых вариантах осуществления $R_2$ и $R_3$ вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют гетероцикл или карбоцикл. В некоторых вариантах осуществления $R_2$ и $R_3$ вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют карбоцикл $C_{3-6}$, такой как фенильная группа. В некоторых вариантах осуществления гетероцикл или $C_{3-6}$ карбоцикл замещают одной или более алкильными группами (например, при одном и том же атоме кольца или при соседних или несмежных атомах кольца). Например, $R_2$ и $R_3$ вместе с атомом, к которому они присоединены, могут образовывать фенильную группу, имеющую одну или более $C_5$ алкильных замен.

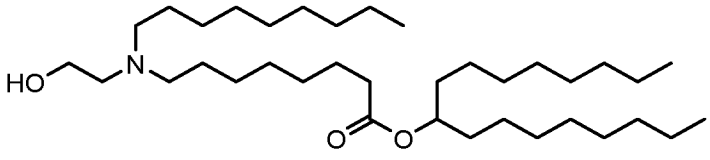
В некоторых вариантах осуществления фармацевтических композиций согласно данному раскрытию соединение формулы (I) выбирают из группы, состоящей из:



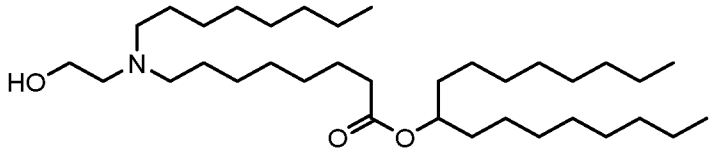

(Соединение 1),



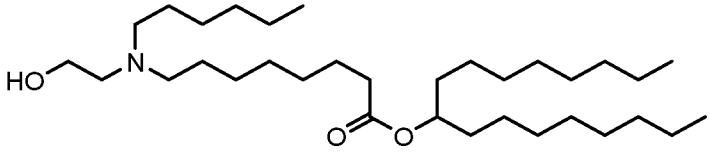
(Соединение 2),



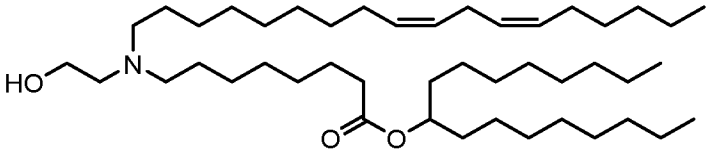
(Соединение 3),



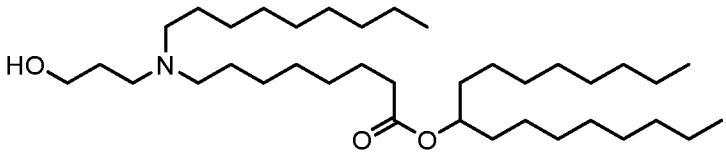
(Соединение 4),



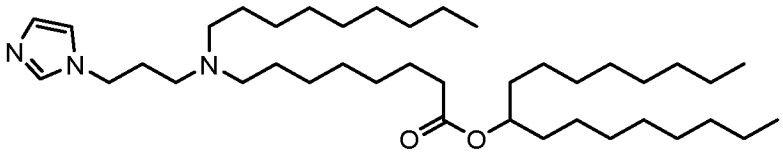
(Соединение 5),



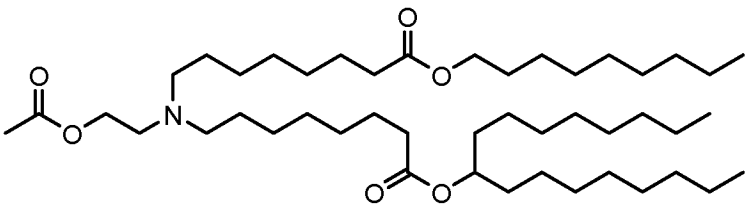
(Соединение 6),



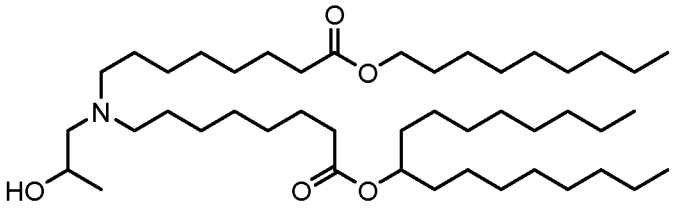
(Соединение 7),



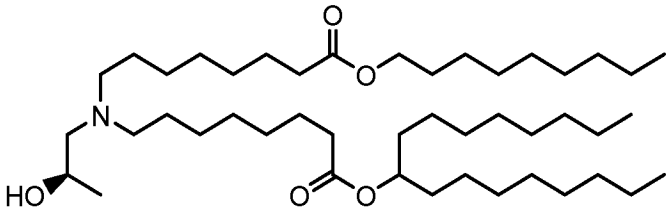
(Соединение 8),



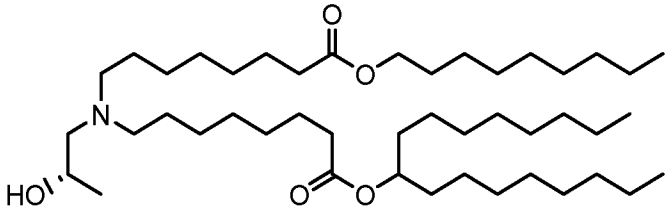
(Соединение 9),



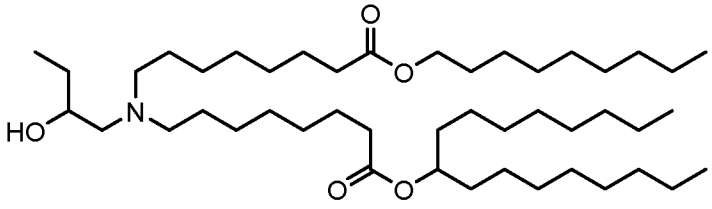
(Соединение 10),



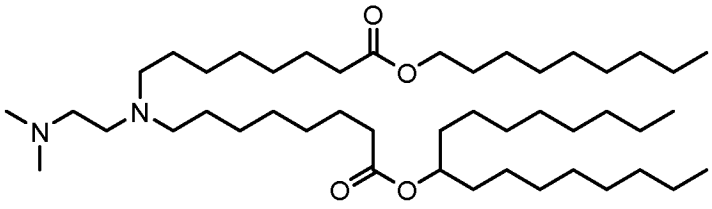
(Соединение 11),



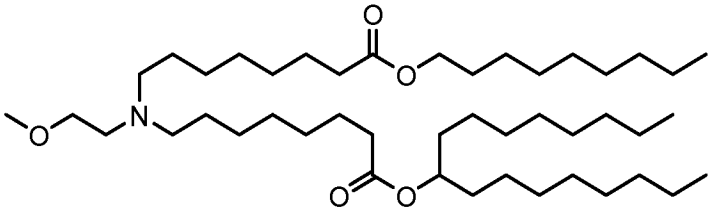
(Соединение 12),



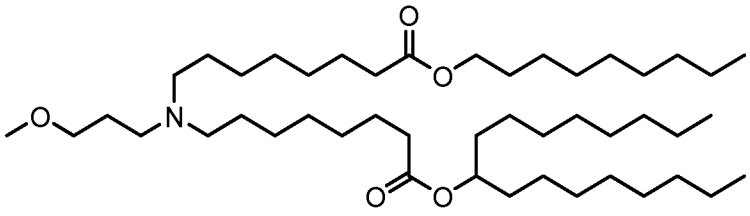
(Соединение 13),



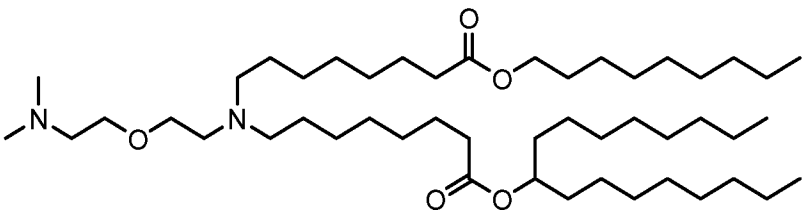
(Соединение 14),



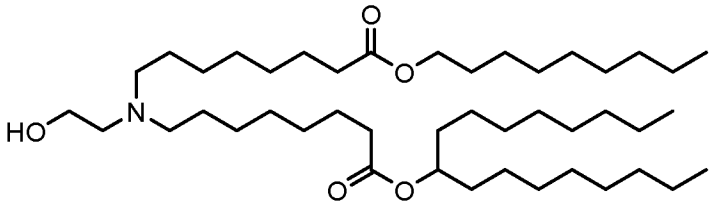
(Соединение 15),



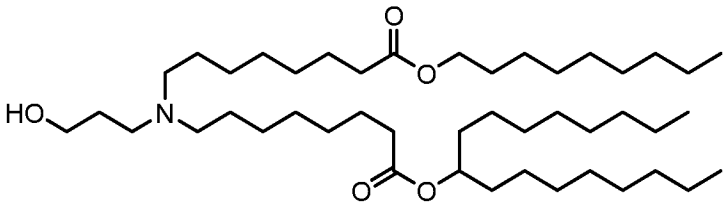
(Соединение 16),



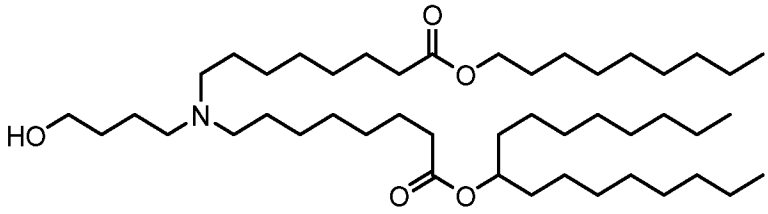
(Соединение 17),



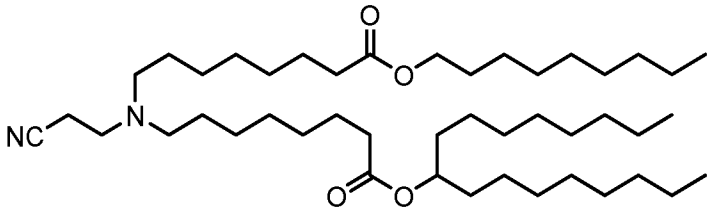
(Соединение 18),



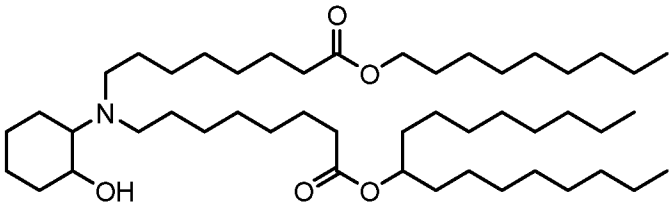
(Соединение 19),



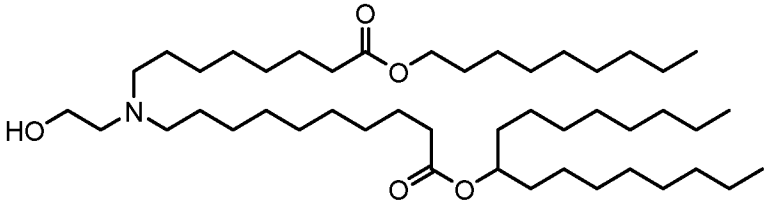
(Соединение 20),



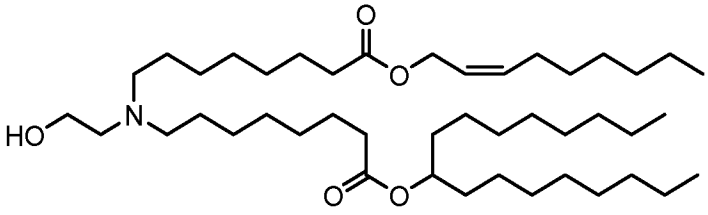
(Соединение 21),



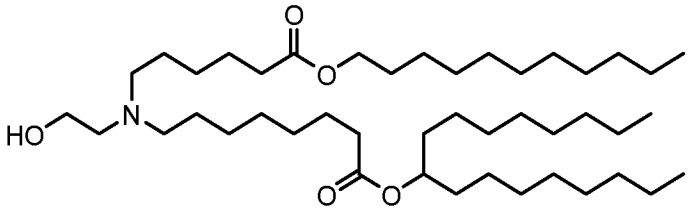
(Соединение 22),



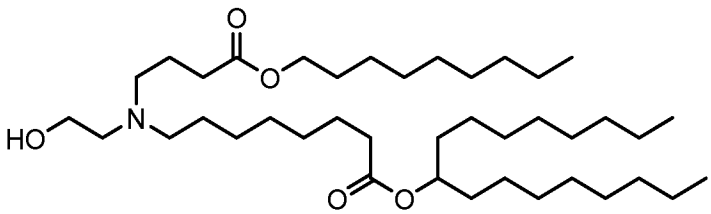
(Соединение 23),



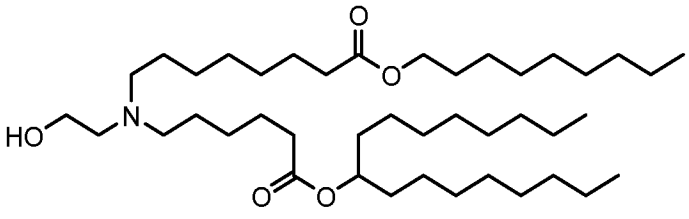
(Соединение 24),



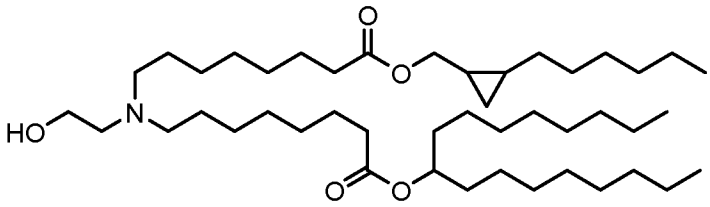
(Соединение 25),



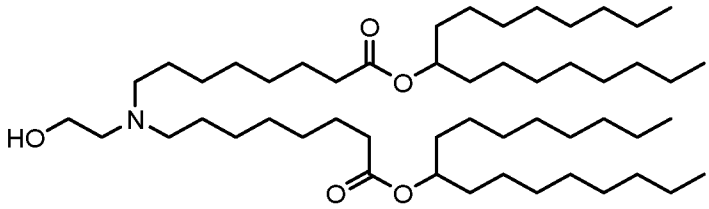
(Соединение 26),



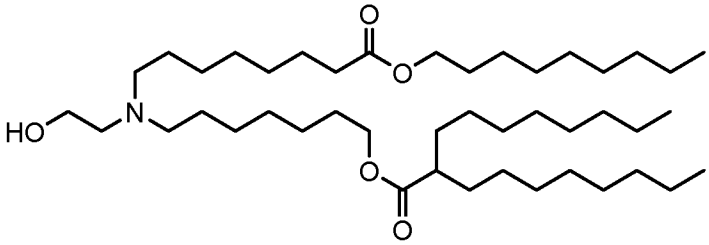
(Соединение 27),



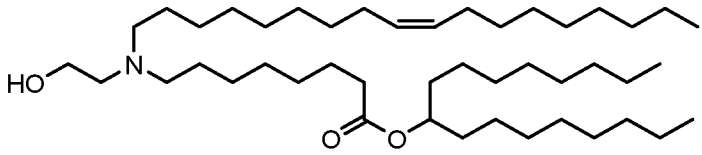
(Соединение 28),



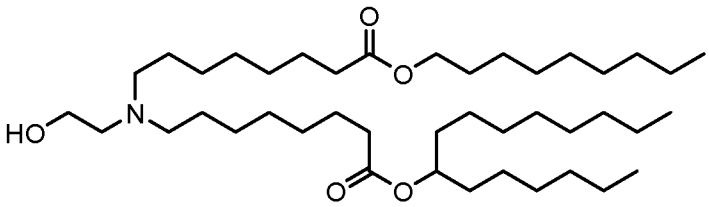
(Соединение 29),



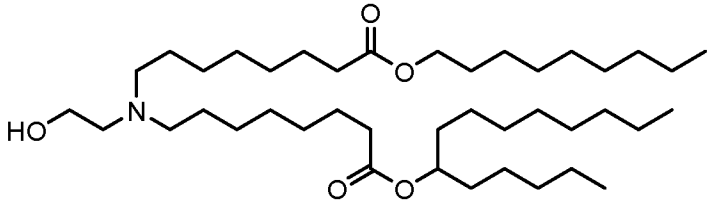
(Соединение 30),



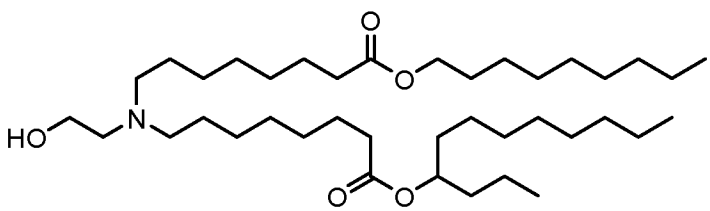
(Соединение 31),



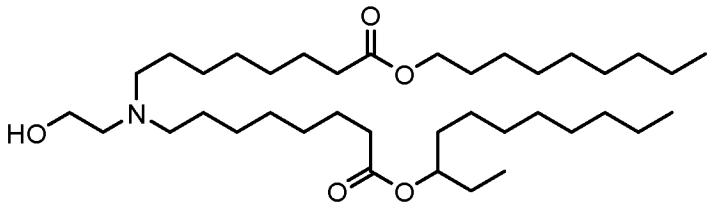
(Соединение 32),



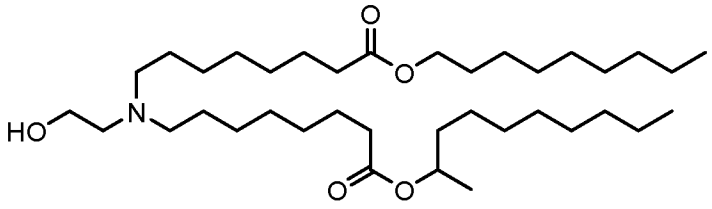
(Соединение 33),



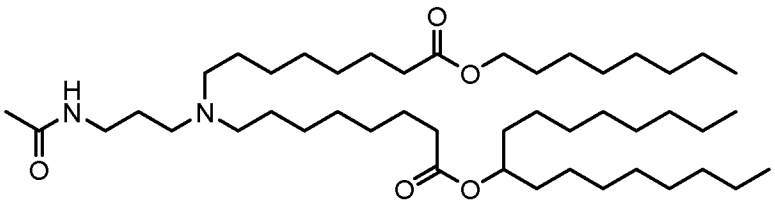
(Соединение 34),



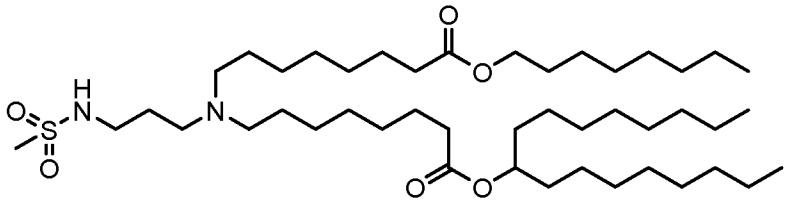
(Соединение 35),



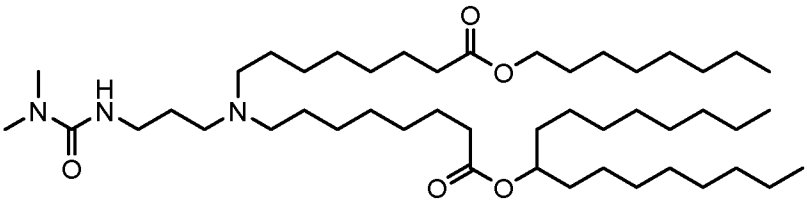
(Соединение 36),



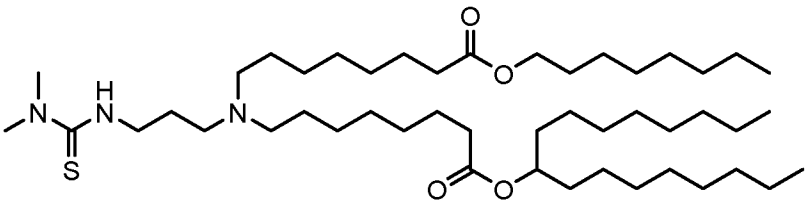
(Соединение 37),



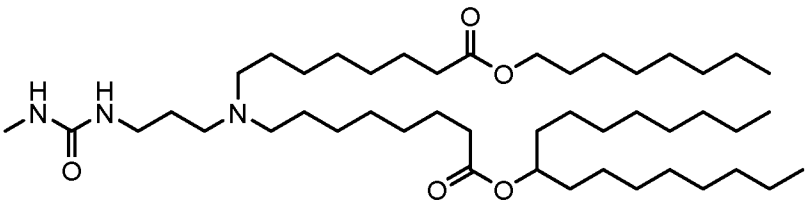
(Соединение 38),



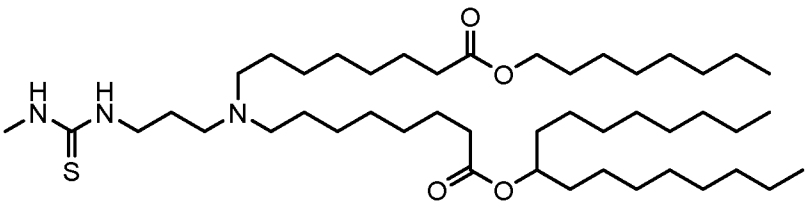
(Соединение 39),



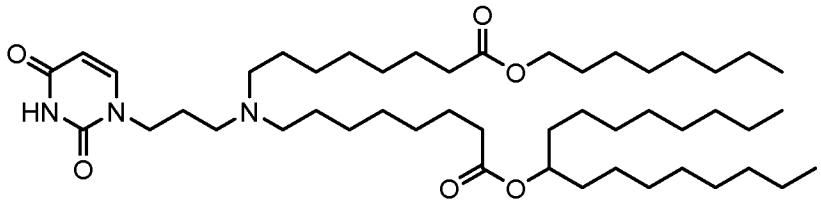
(Соединение 40),



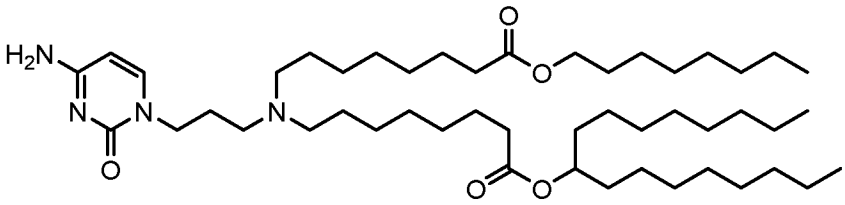
(Соединение 41),



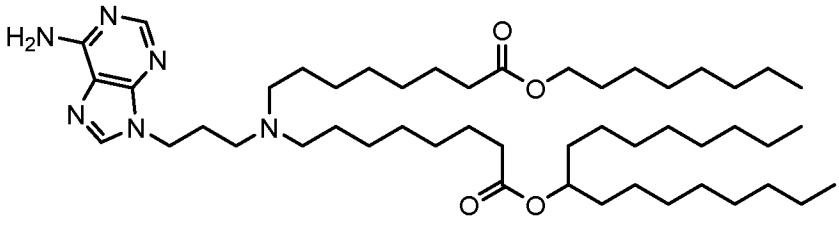
(Соединение 42),



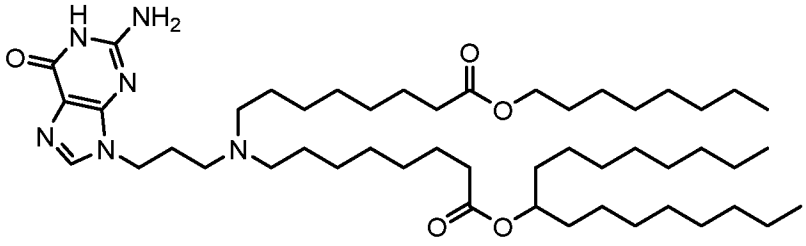
(Соединение 43),



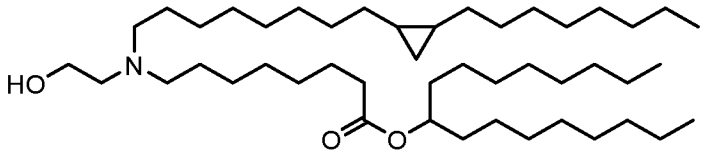
(Соединение 44),



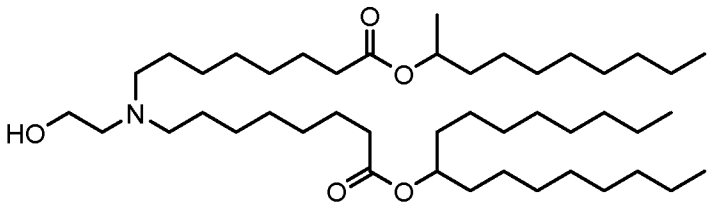
(Соединение 45),



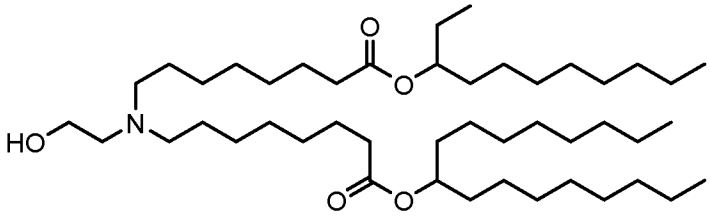
(Соединение 46),



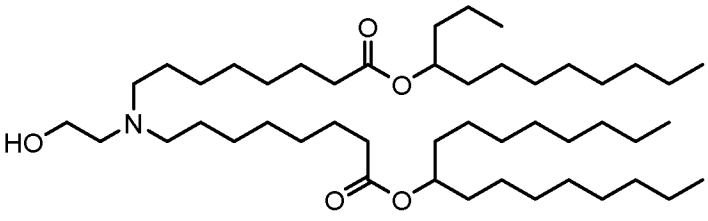
(Соединение 47),



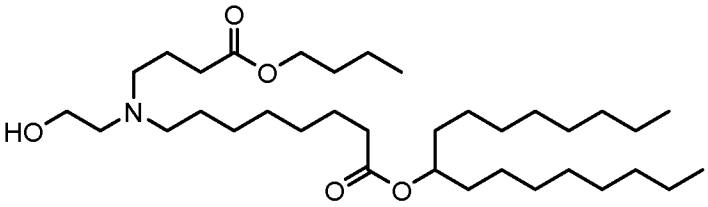
(Соединение 48),



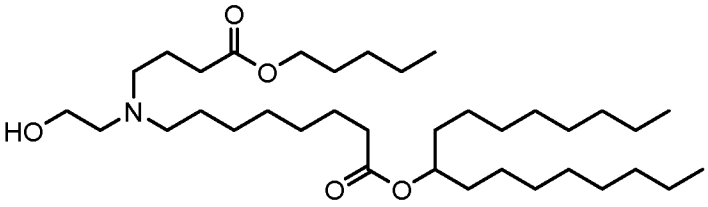
(Соединение 49),



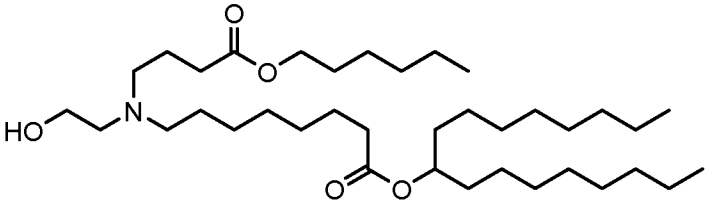
(Соединение 50),



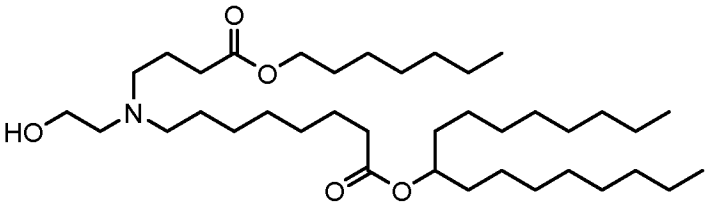
(Соединение 51),



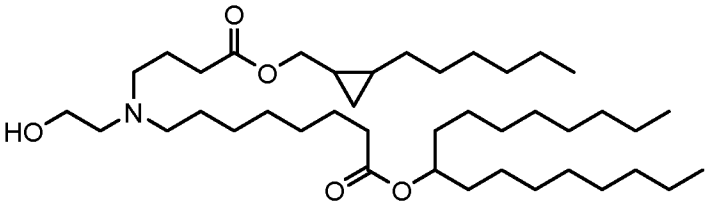
(Соединение 52),



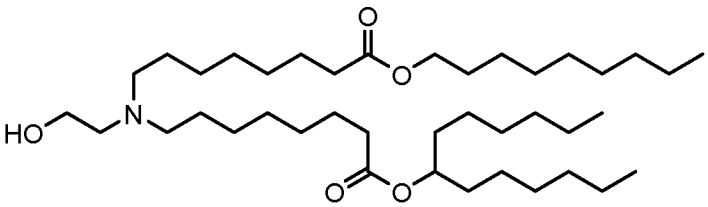
(Соединение 53),



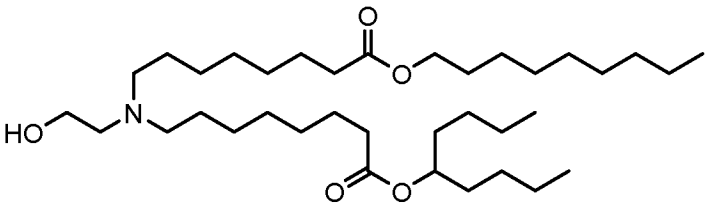
(Соединение 54),



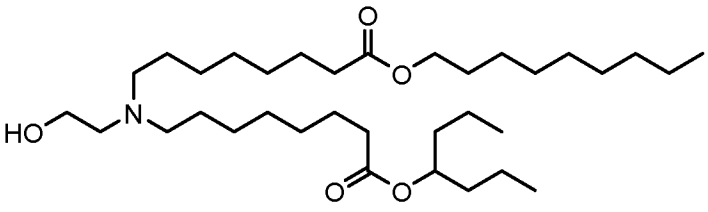
(Соединение 55),



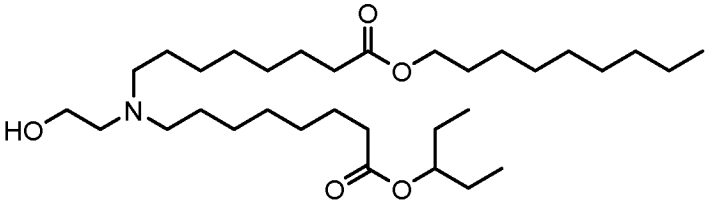
(Соединение 56),



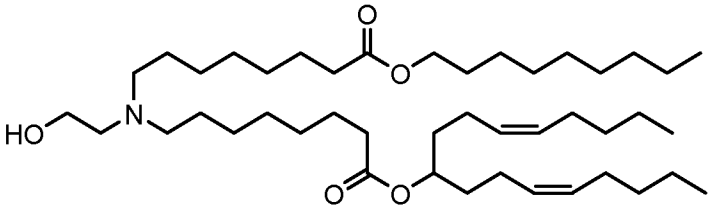
(Соединение 57),



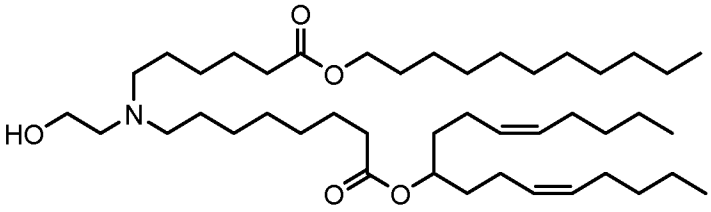
(Соединение 58),



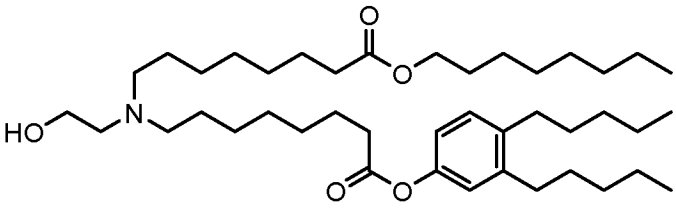
(Соединение 59),



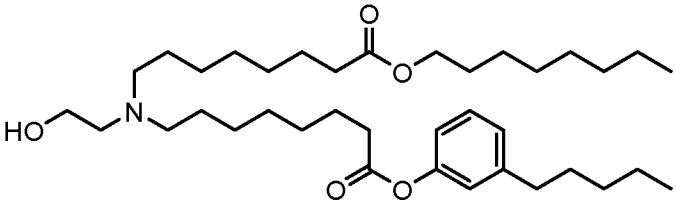
(Соединение 60),



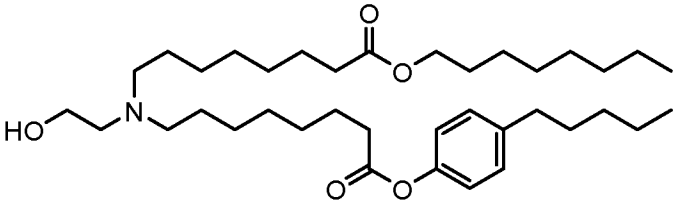
(Соединение 61),



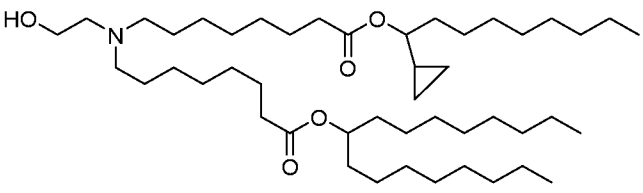
(Соединение 62),



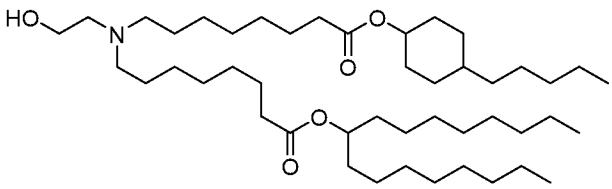
(Соединение 63),



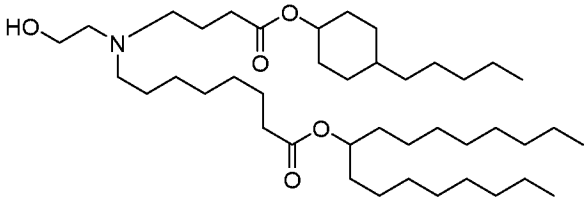
(Соединение 64),



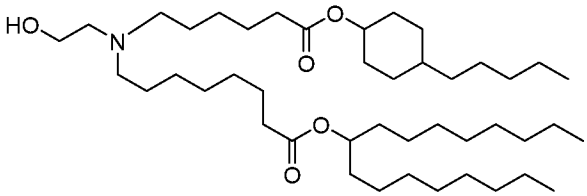
(Соединение 65),



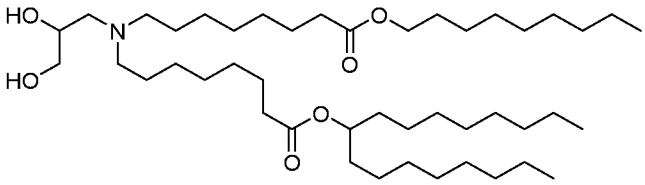
(Соединение 66),



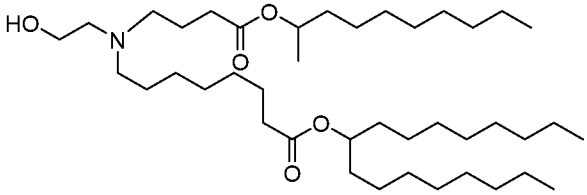
(Соединение 67),



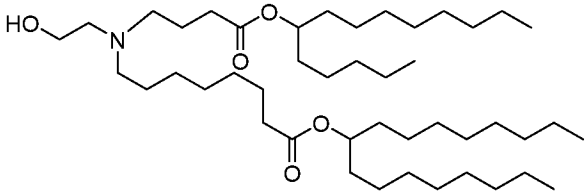
(Соединение 68),



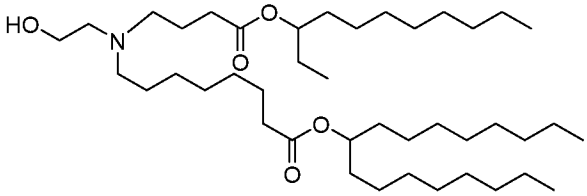
(Соединение 69),



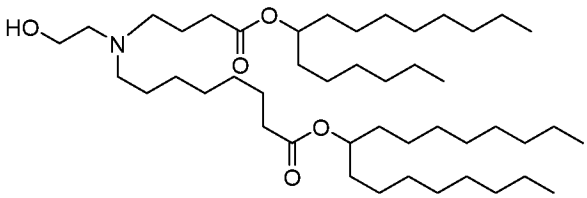
(Соединение 70),



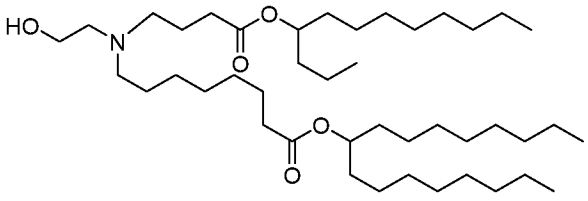
(Соединение 71),



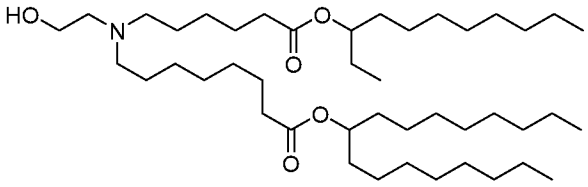
(Соединение 72),



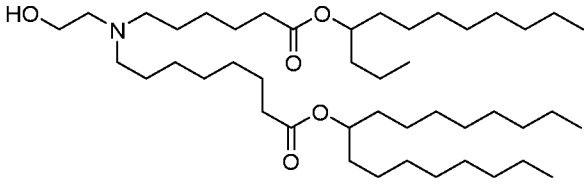
(Соединение 73),



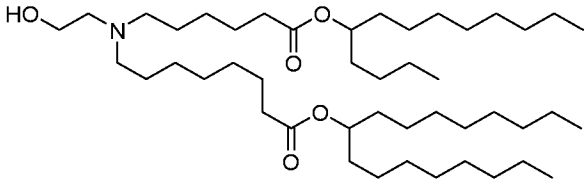
(Соединение 74),



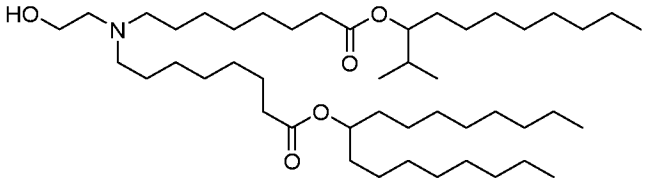
(Соединение 75),



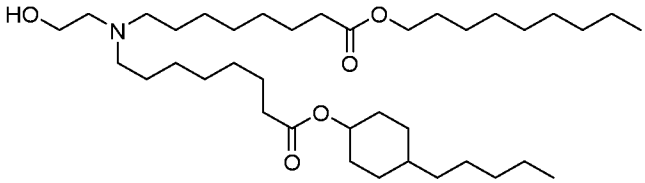
(Соединение 76),



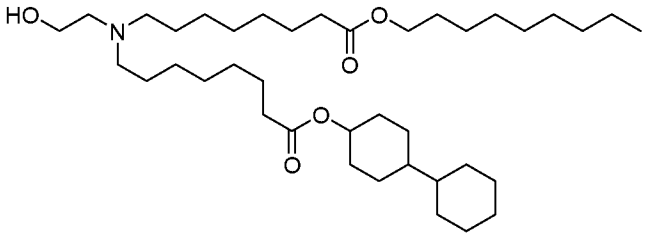
(Соединение 77),



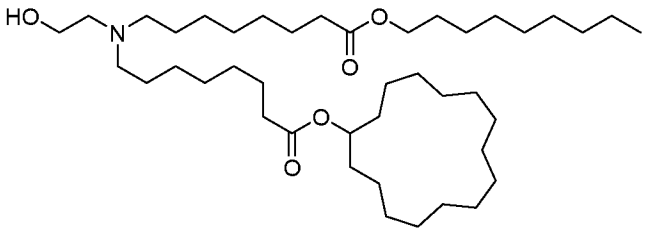
(Соединение 78),



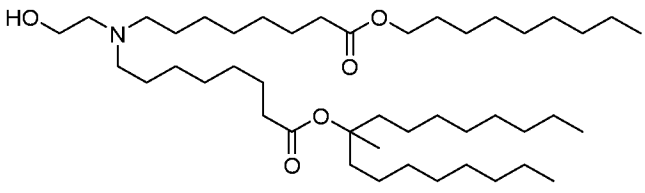
(Соединение 79),



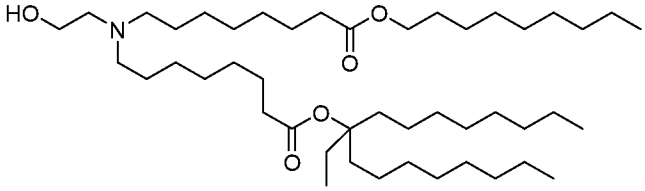
(Соединение 80),



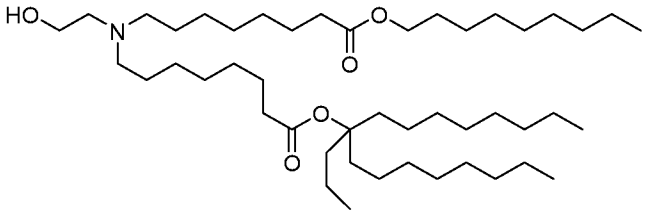
(Соединение 81),



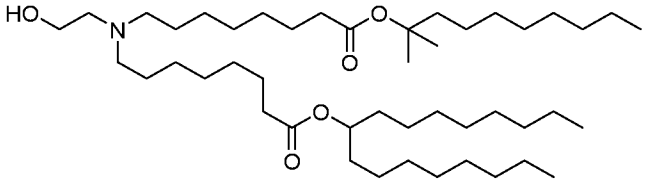
(Соединение 82),



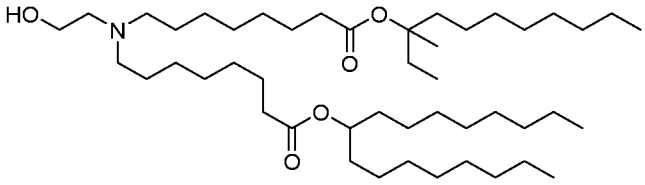
(Соединение 83),



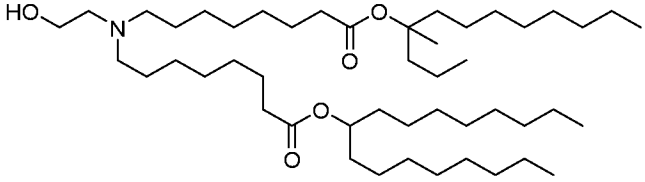
(Соединение 84),



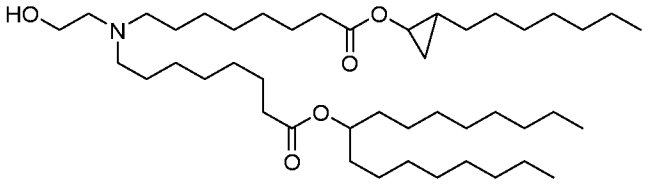
(Соединение 85),



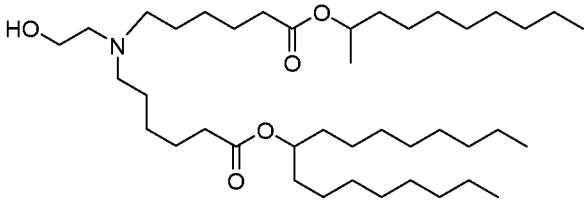
(Соединение 86),



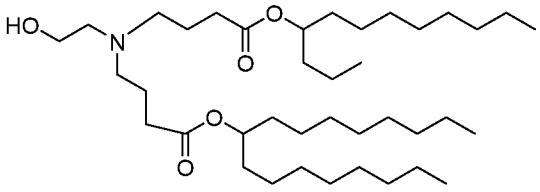
(Соединение 87),



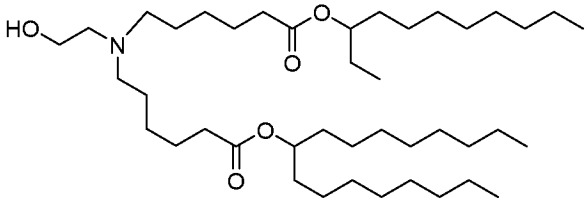
(Соединение 88),



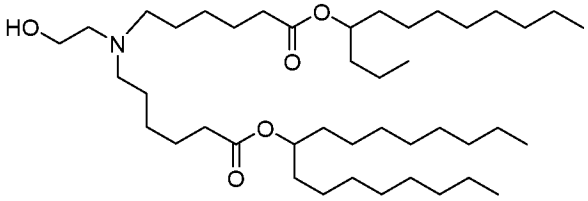
(Соединение 89),



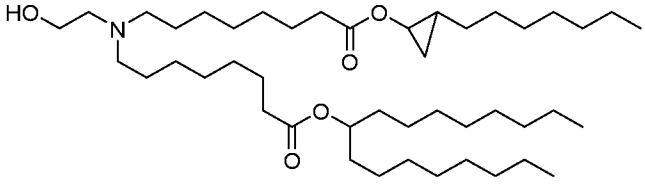
(Соединение 90),



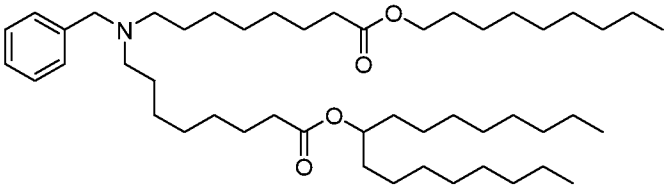
(Соединение 91),



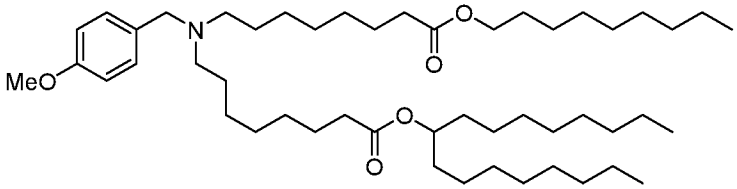
(Соединение 92),



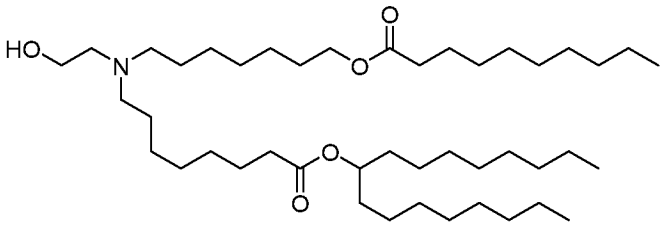
(Соединение 93),



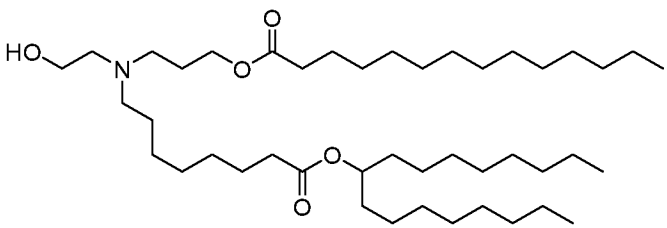
(Соединение 94),



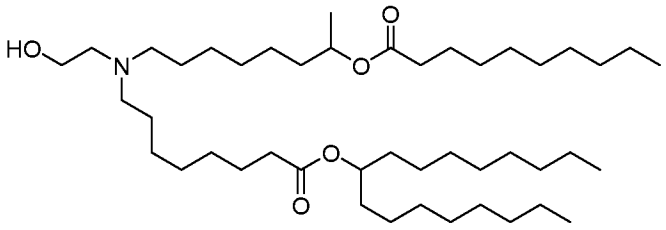
(Соединение 95),



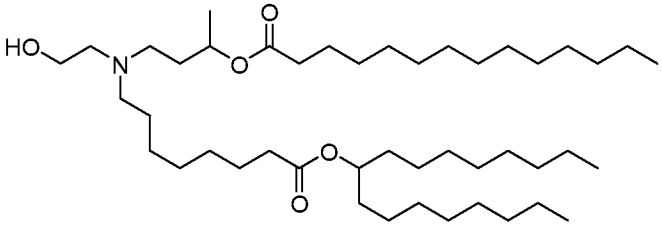
(Соединение 96),



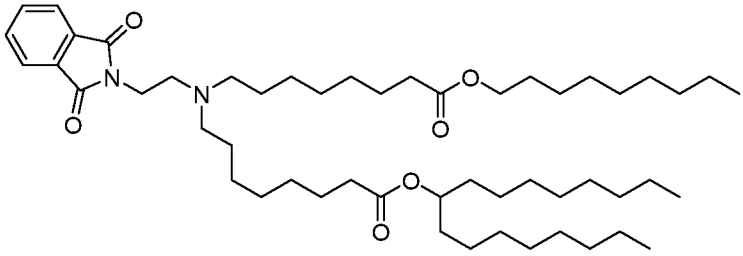
(Соединение 97),



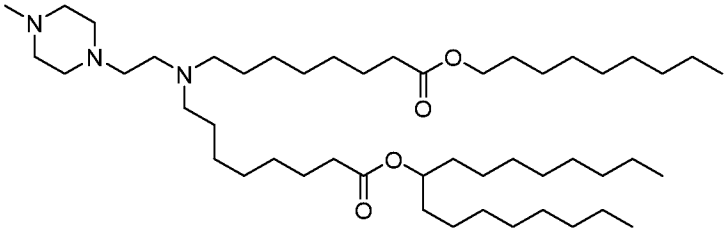
(Соединение 98),



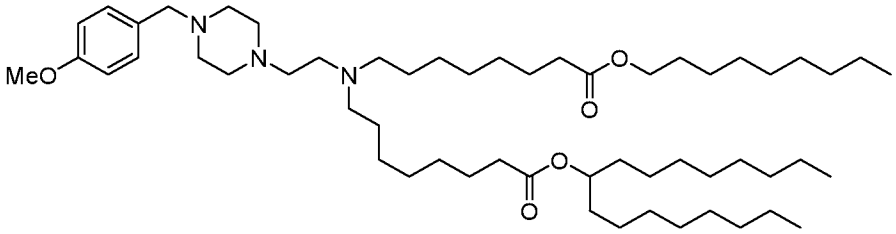
(Соединение 99),



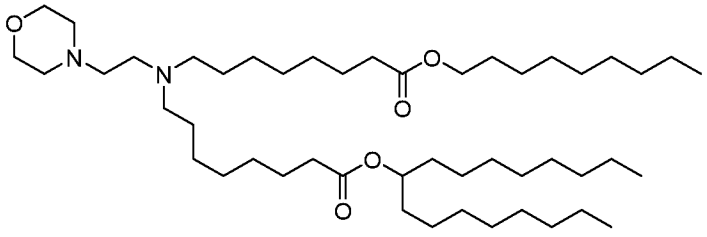
(Соединение 100),



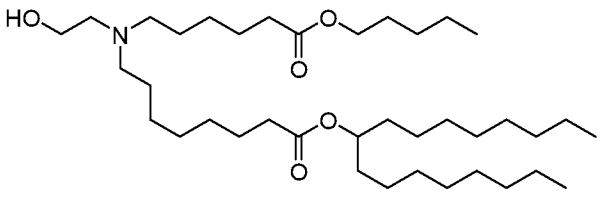
(Соединение 101),



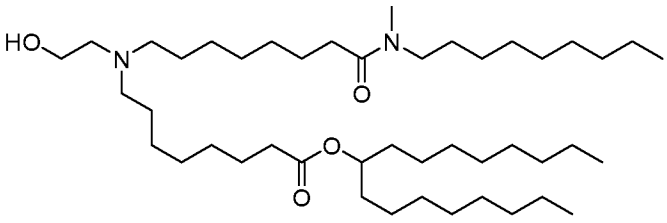
(Соединение 102),



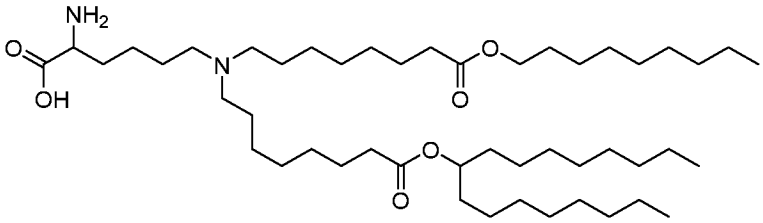
(Соединение 103),



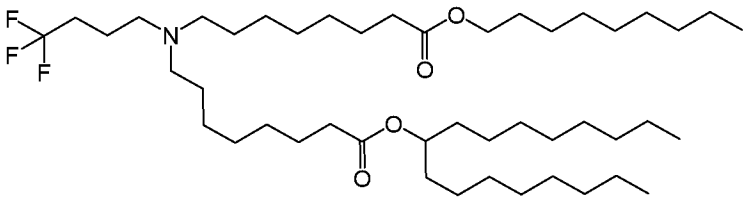
(Соединение 104),



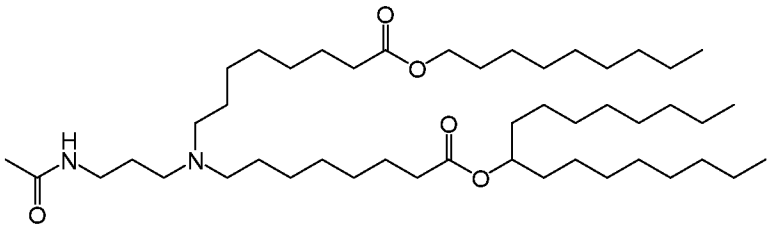
(Соединение 105),



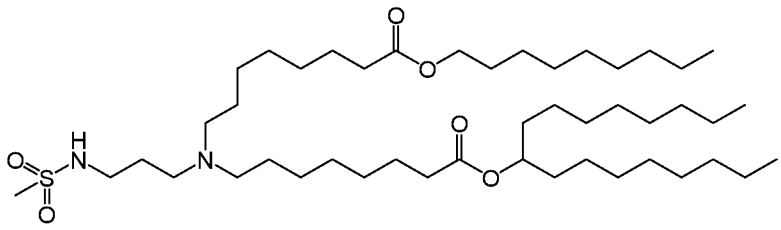
(Соединение 106),



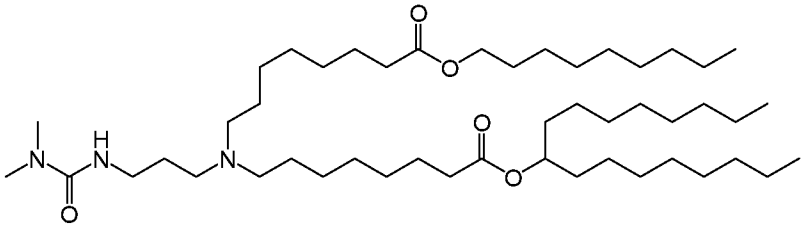
(Соединение 107),



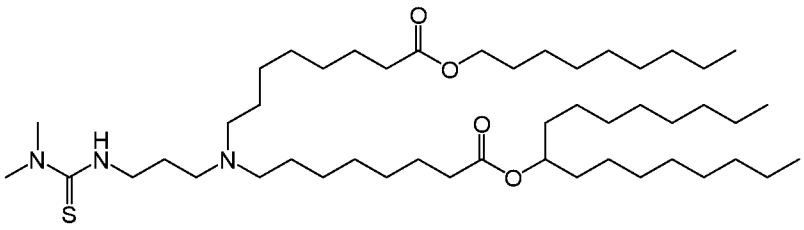
(Соединение 108),



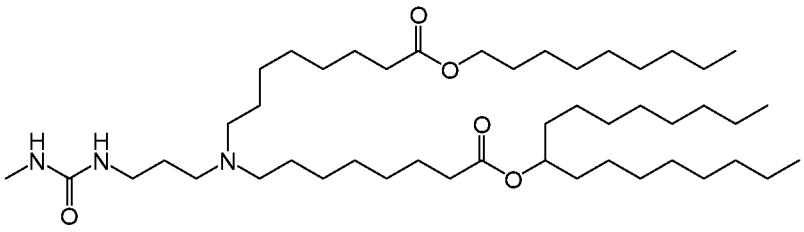
(Соединение 109),



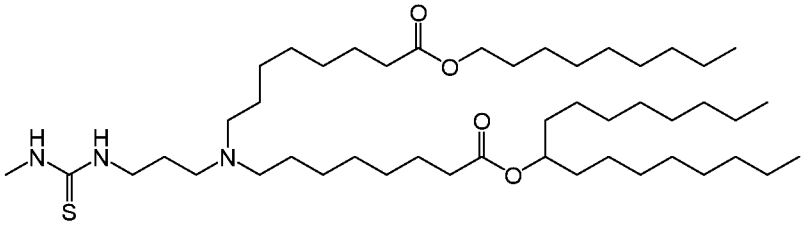
(Соединение 110),



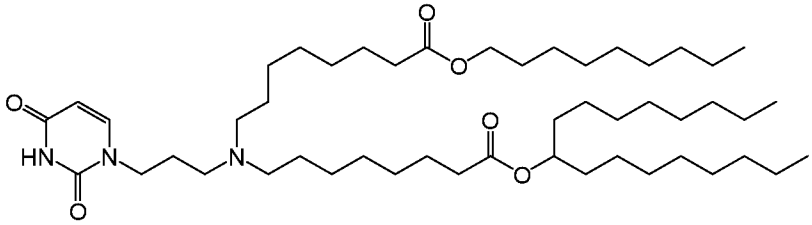
(Соединение 111),



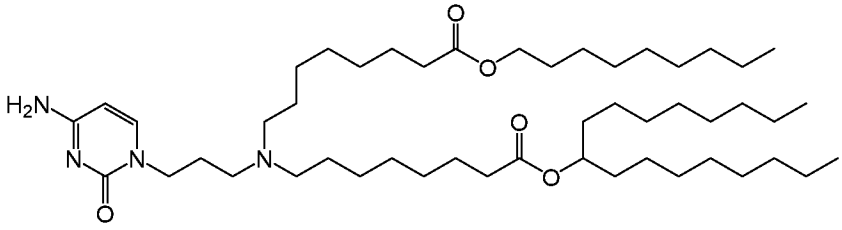
(Соединение 112),



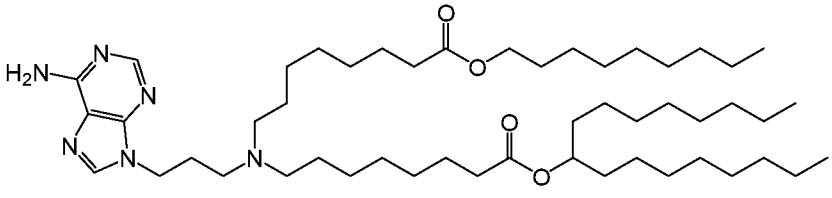
(Соединение 113),



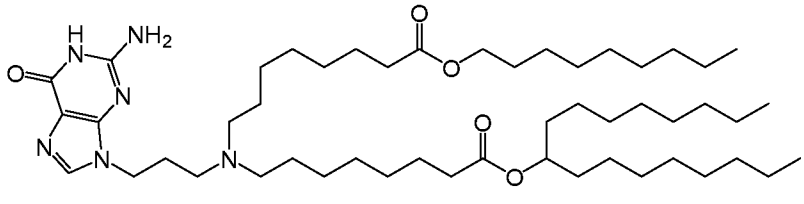
(Соединение 114),



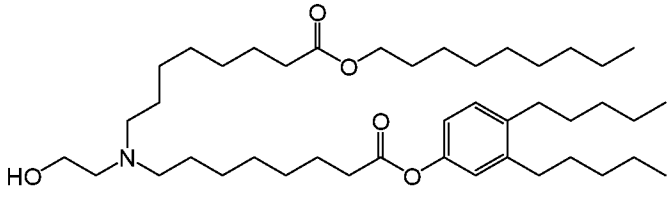
(Соединение 115),



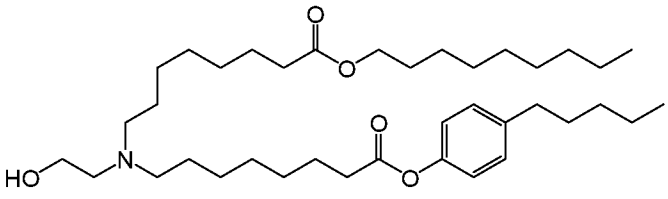
(Соединение 116),



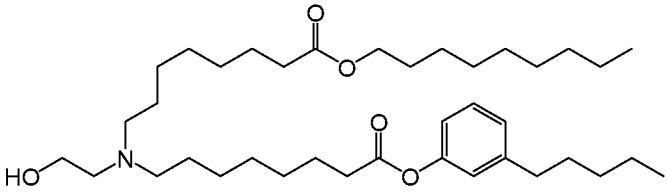
(Соединение 117),



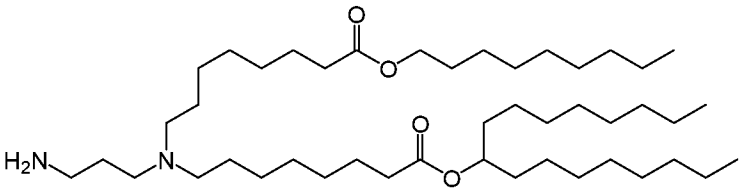
(Соединение 118),



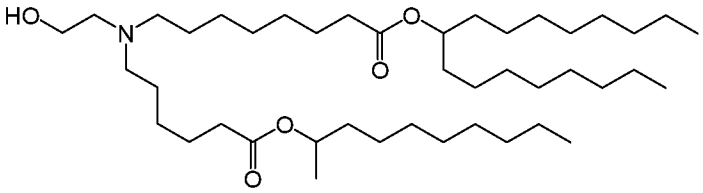
(Соединение 119),



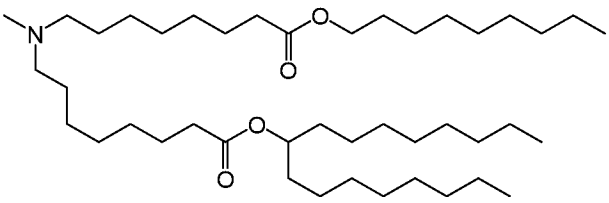
(Соединение 120),



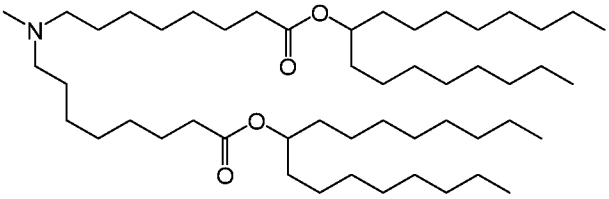
(Соединение 121),



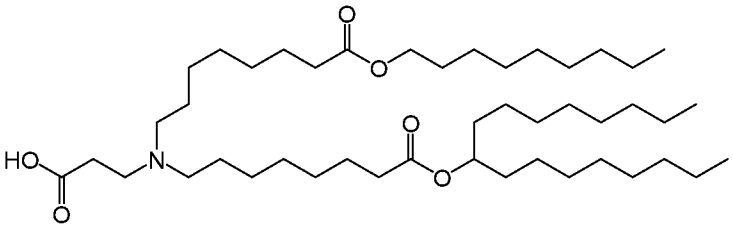
(Соединение 122),



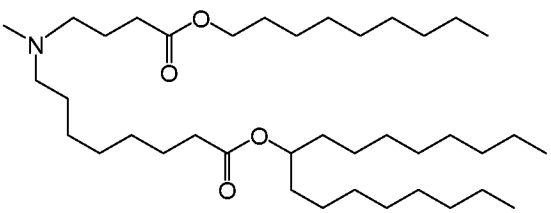
(Соединение 123),



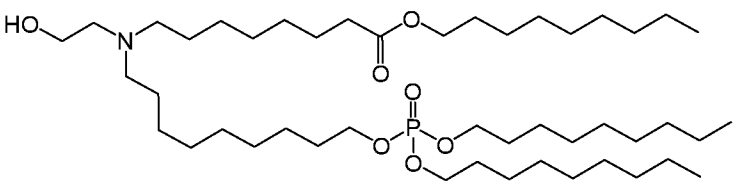
(Соединение 124),



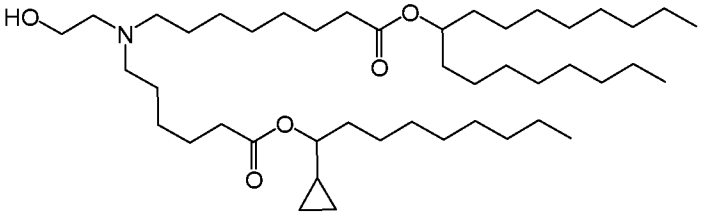
(Соединение 125),



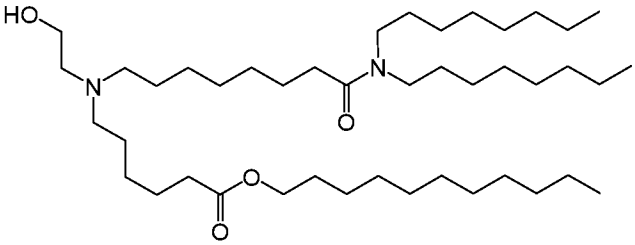
(Соединение 126),



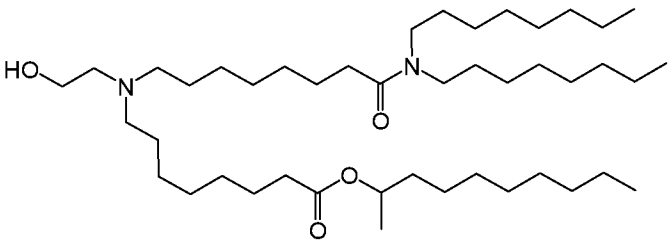
(Соединение 127),



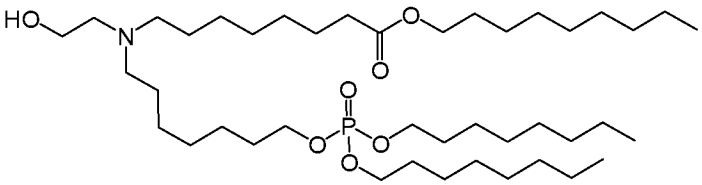
(Соединение 128),



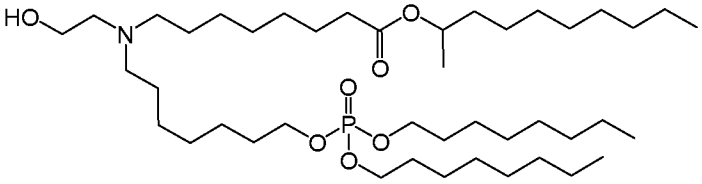
(Соединение 129),



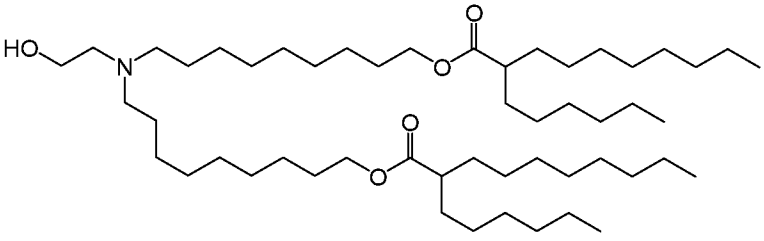
(Соединение 130),



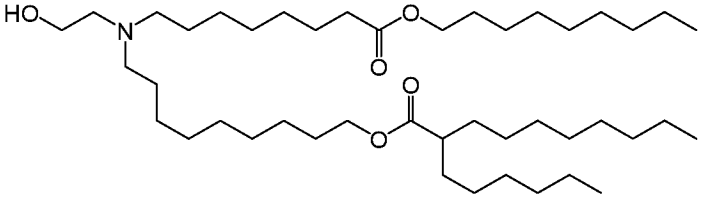
(Соединение 131),



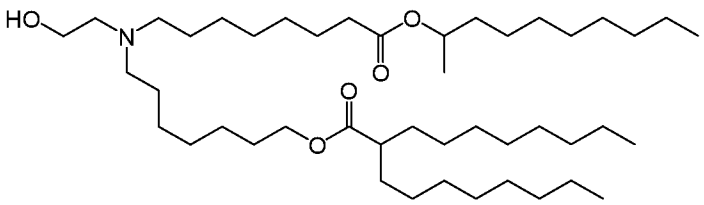
(Соединение 132),



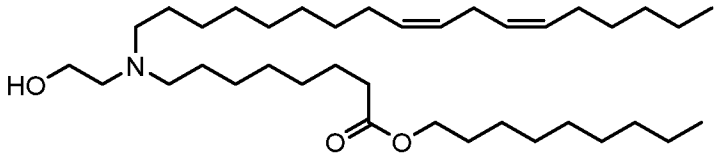
(Соединение 133),



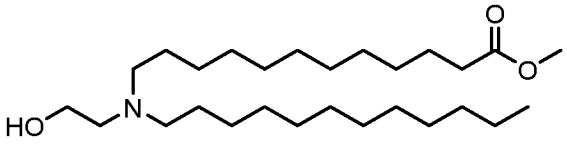
(Соединение 134),



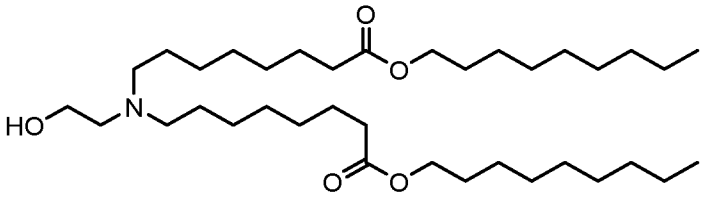
(Соединение 135),



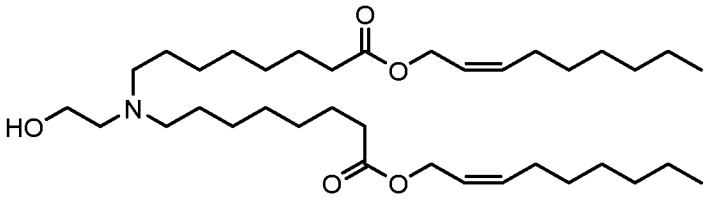
(Соединение 136),



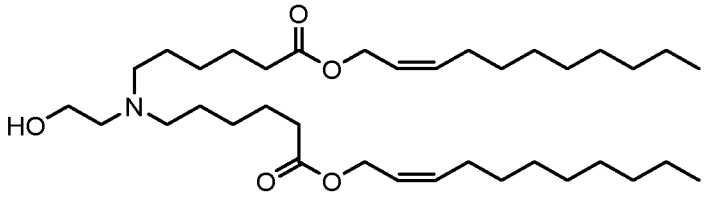
(Соединение 137),



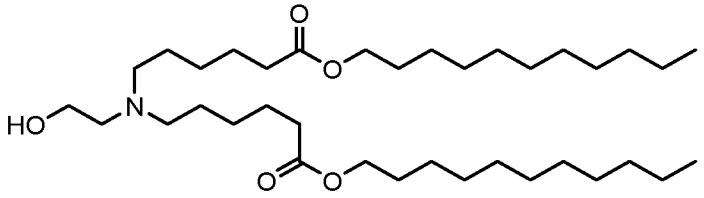
(Соединение 138),



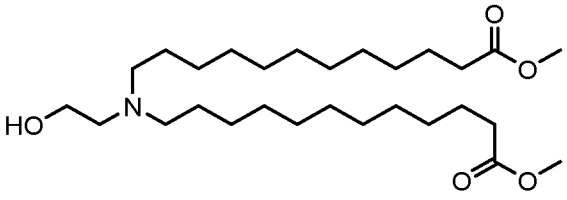
(Соединение 139),



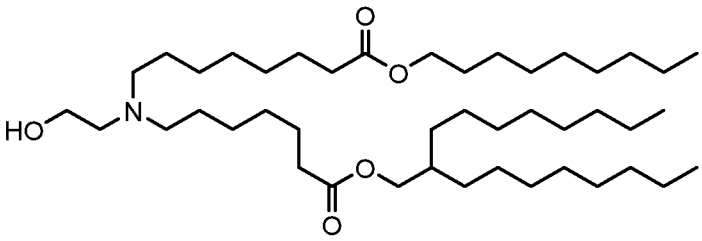
(Соединение 140),



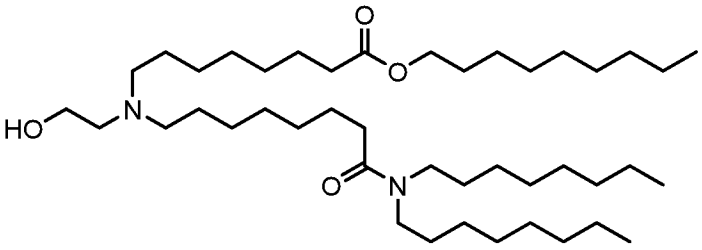
(Соединение 141),



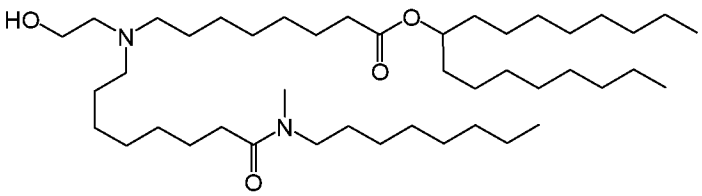
(Соединение 142),



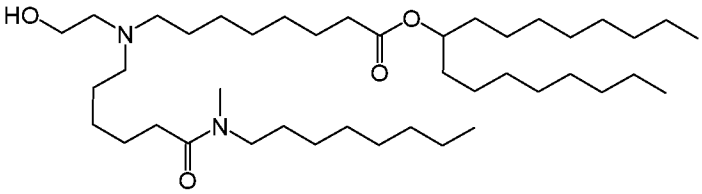
(Соединение 143),



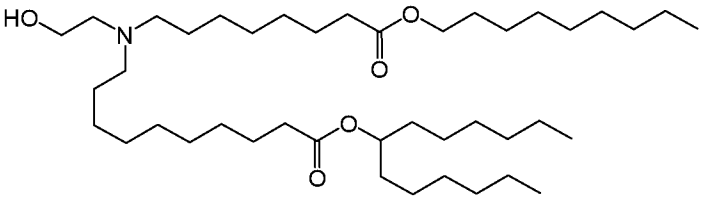
(Соединение 144),



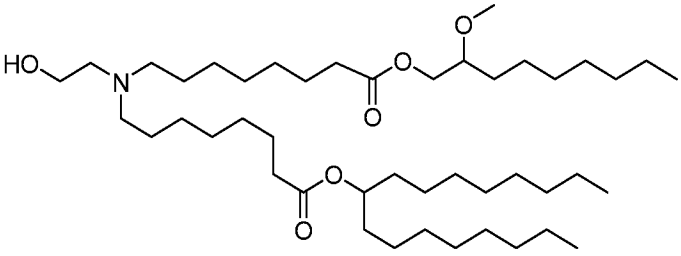
(Соединение 145),



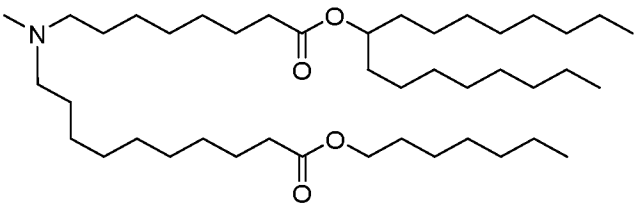
(Соединение 146),



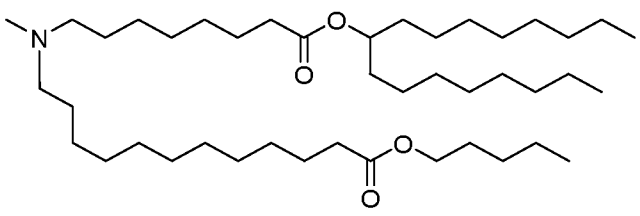
(Соединение 147),



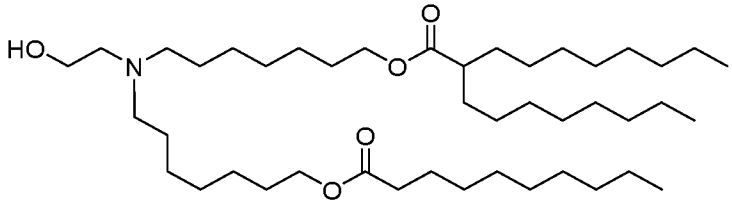
(Соединение 148),



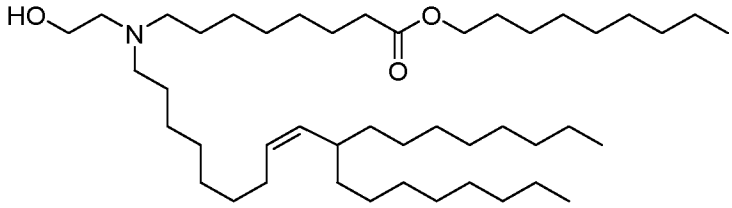
(Соединение 149),



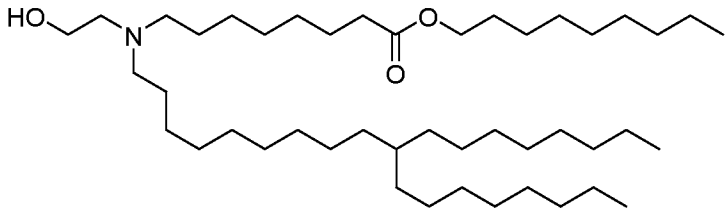
(Соединение 150),



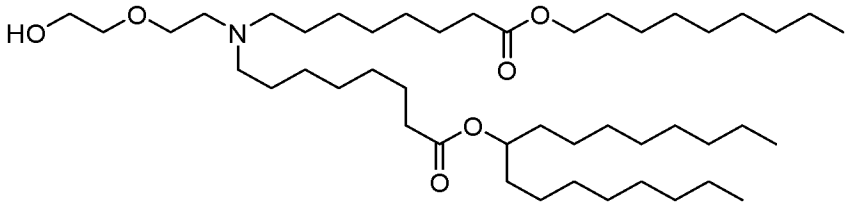
(Соединение 151),



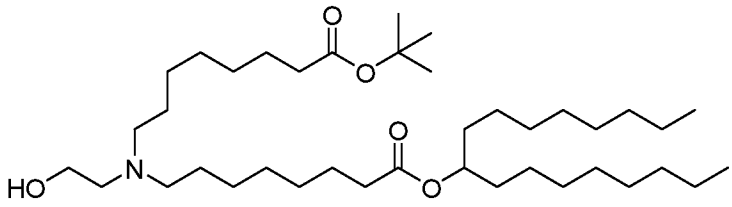
(Соединение 152),



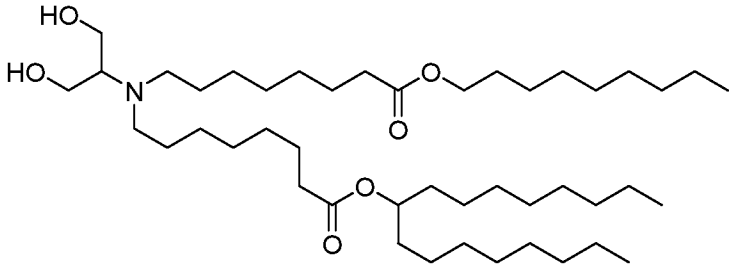
(Соединение 153),



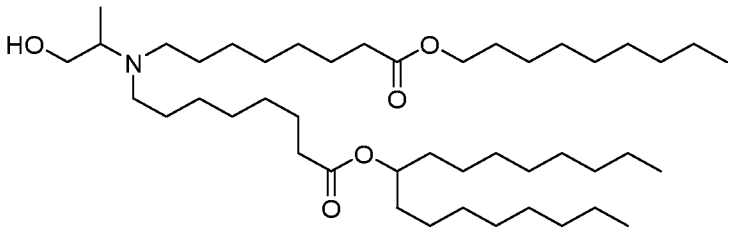
(Соединение 154),



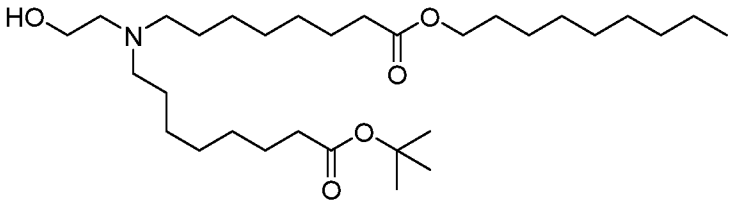
(Соединение 155),



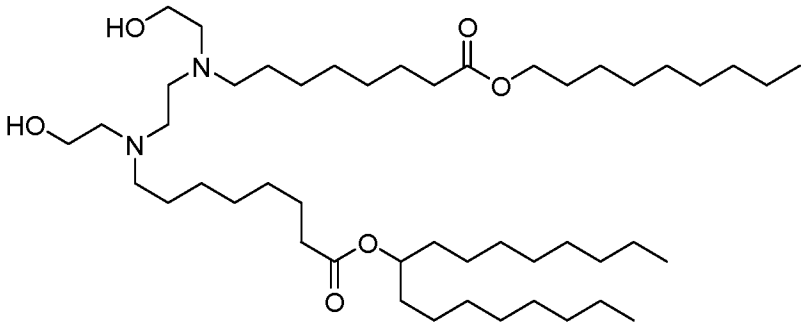
(Соединение 156),



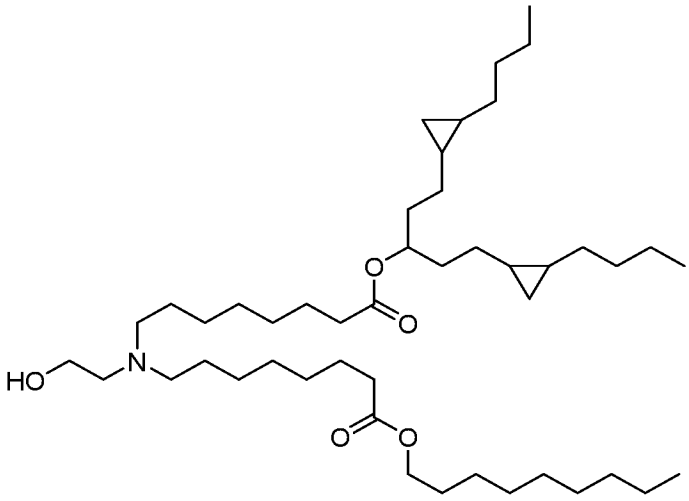
(Соединение 157),



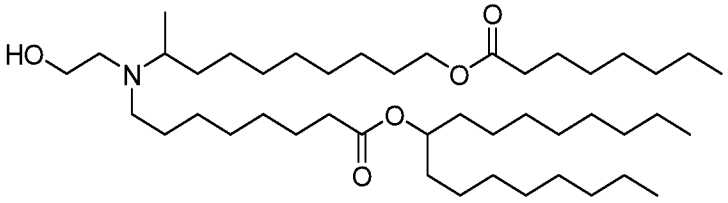
(Соединение 158),



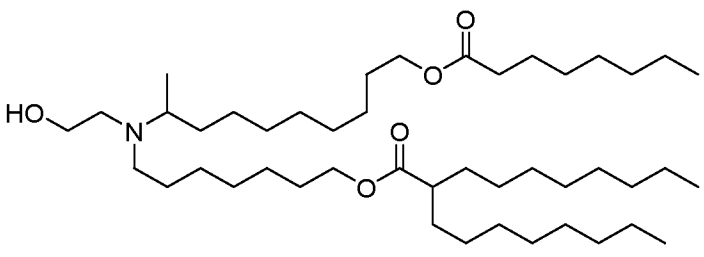
(Соединение 159),



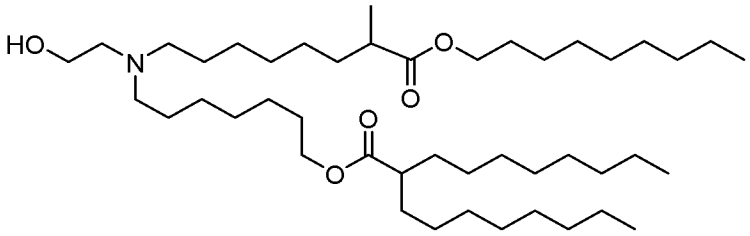
(Соединение 160),



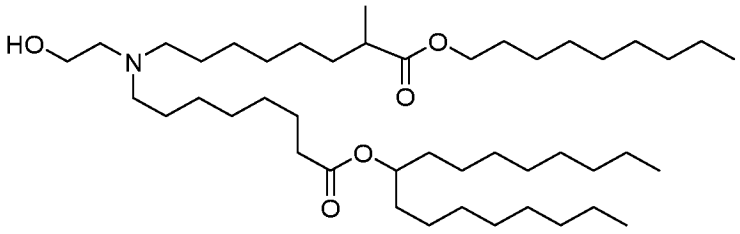
(Соединение 161),



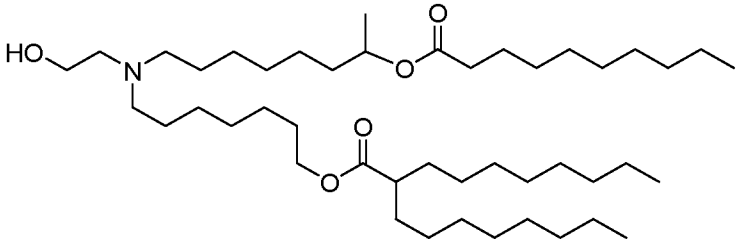
(Соединение 162),



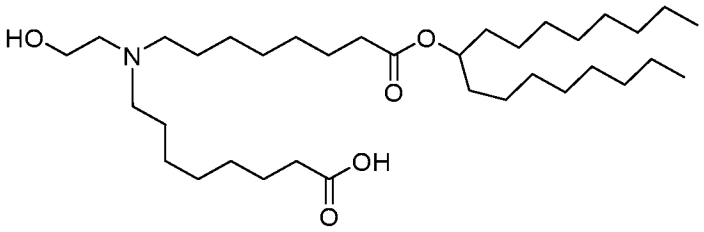
(Соединение 163),



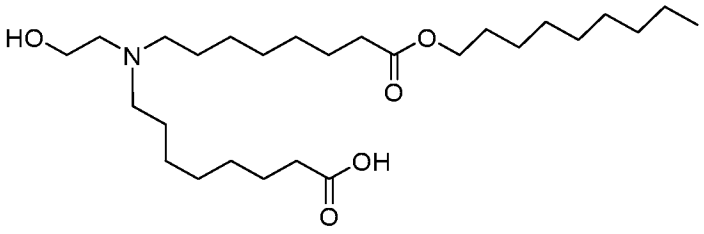
(Соединение 164),



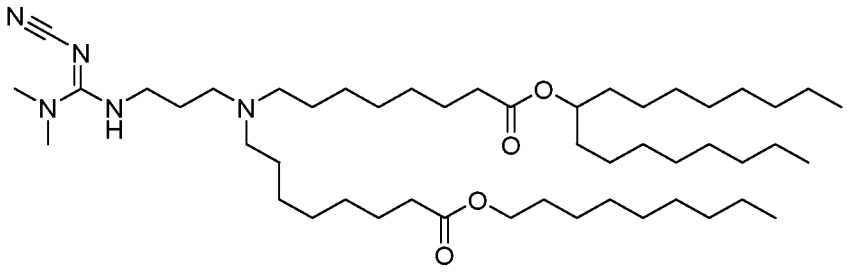
(Соединение 165),



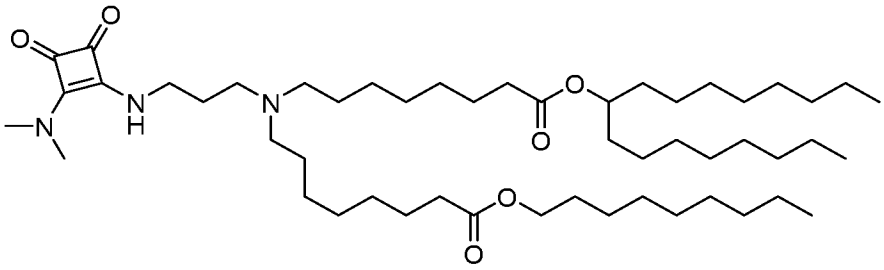
(Соединение 166),



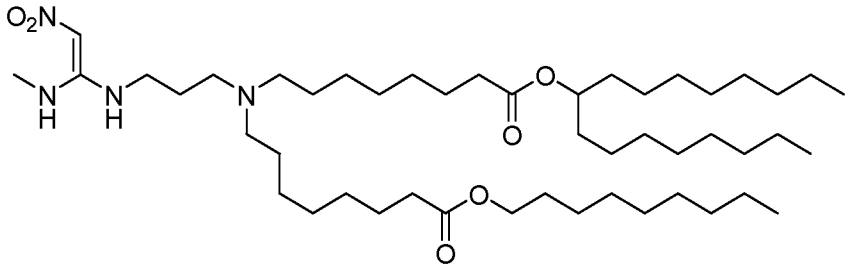
(Соединение 167),



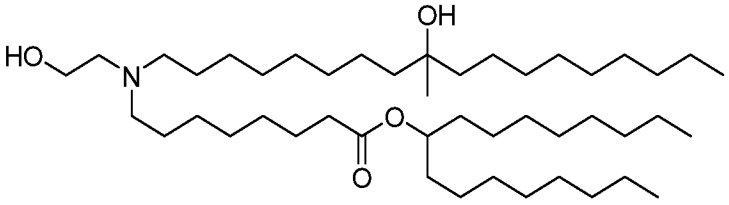
(Соединение 168),



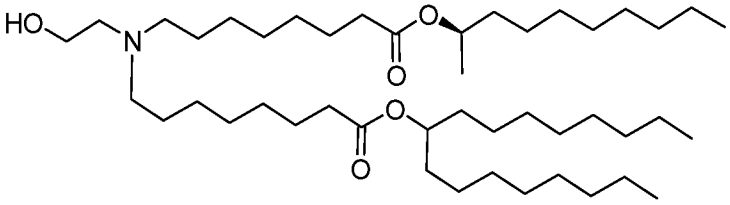
(Соединение 169),



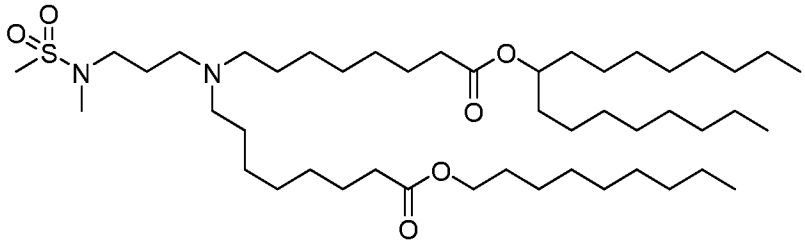
(Соединение 170),



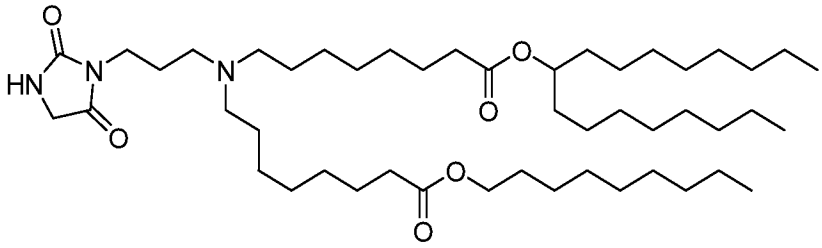
(Соединение 171),



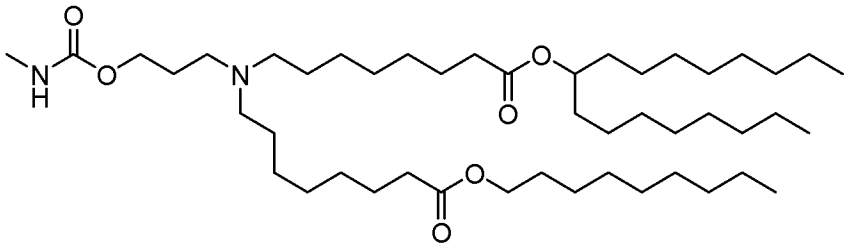
(Соединение 172),



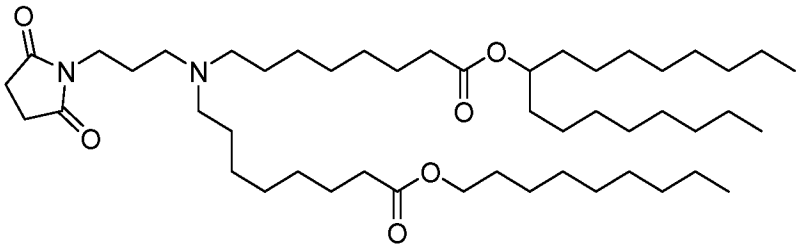
(Соединение 173),



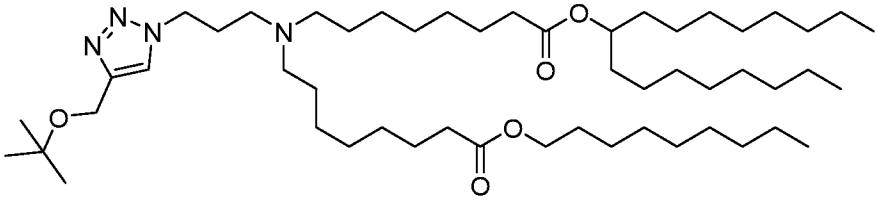
(Соединение 174),



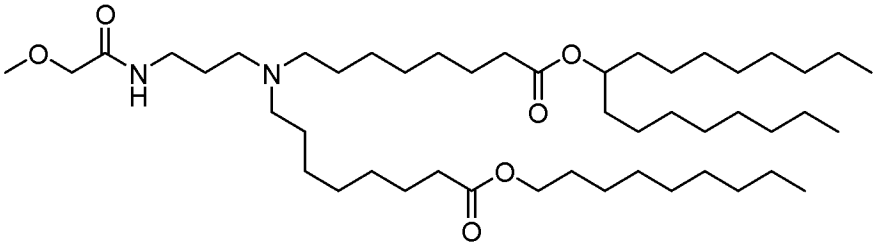
(Соединение 175),



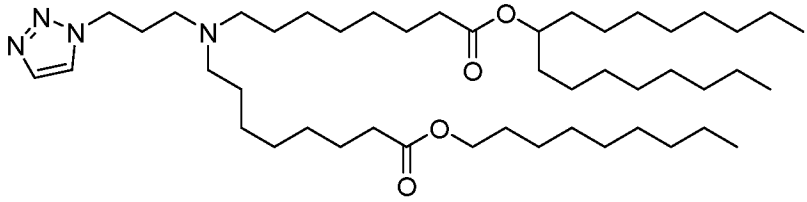
(Соединение 176),



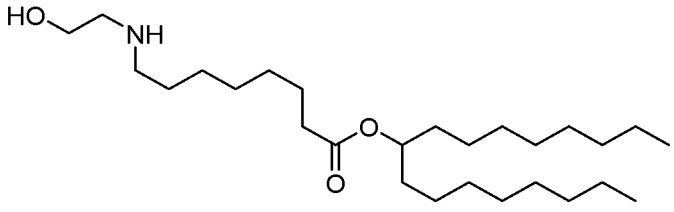
(Соединение 177),



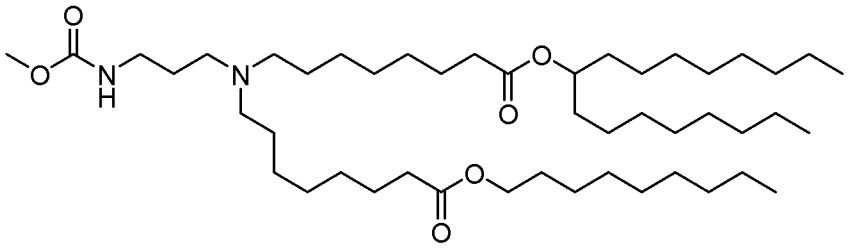
(Соединение 178),



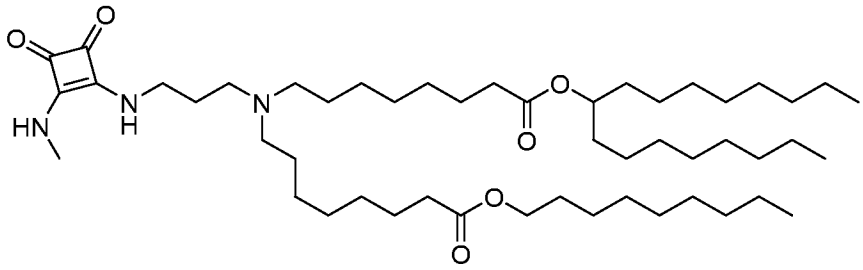
(Соединение 179),



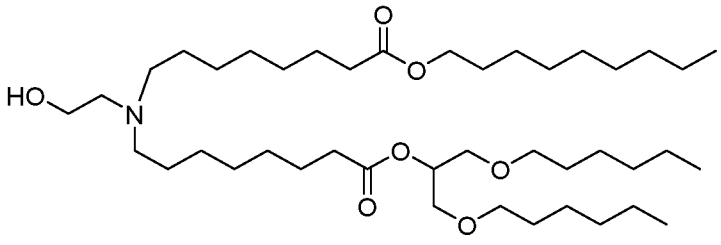
(Соединение 180),



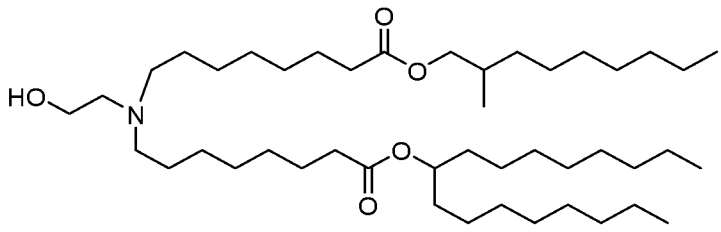
(Соединение 181),



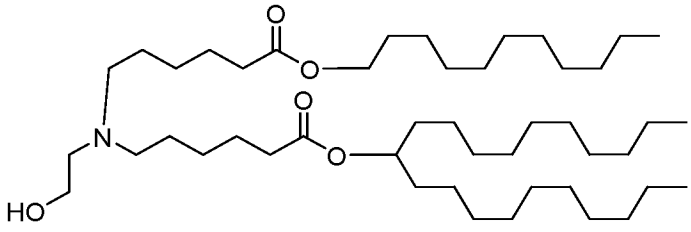
(Соединение 182),



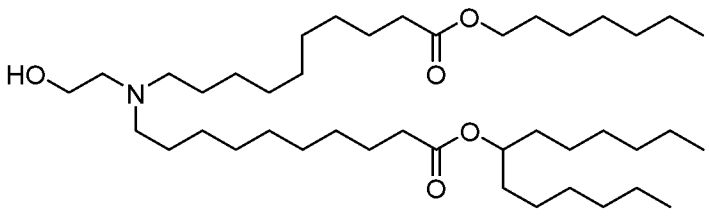
(Соединение 183),



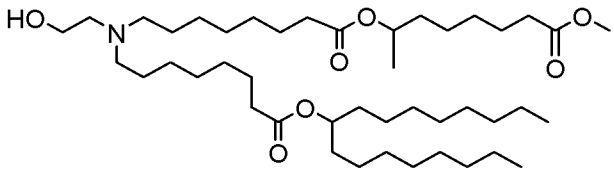
(Соединение 184),



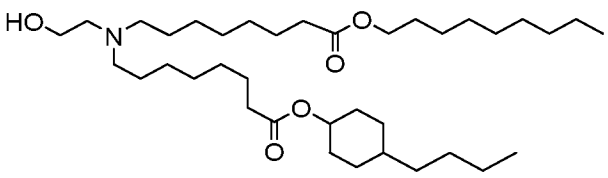
(Соединение 185),



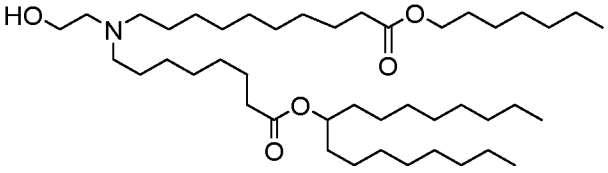
(Соединение 186),



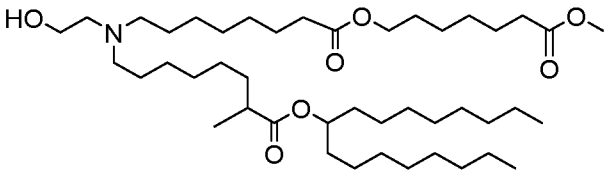
(Соединение 187),



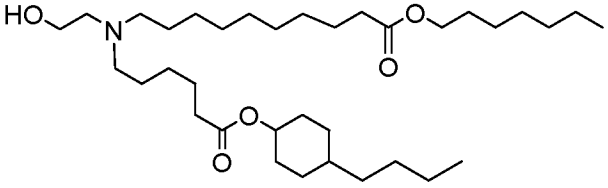
(Соединение 188),



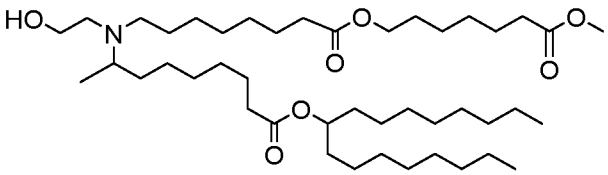
(Соединение 189),



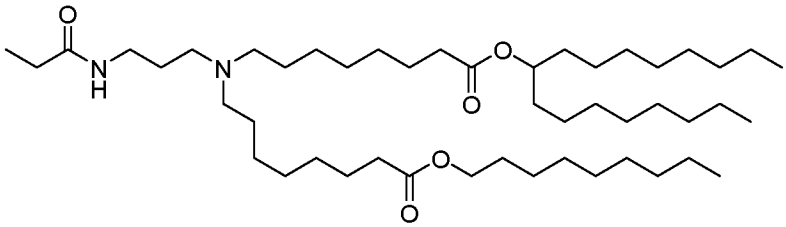
(Соединение 190),



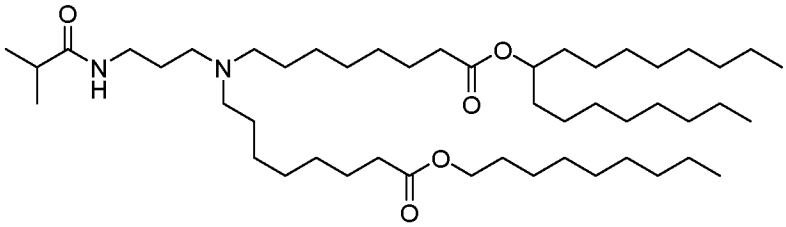
(Соединение 191),



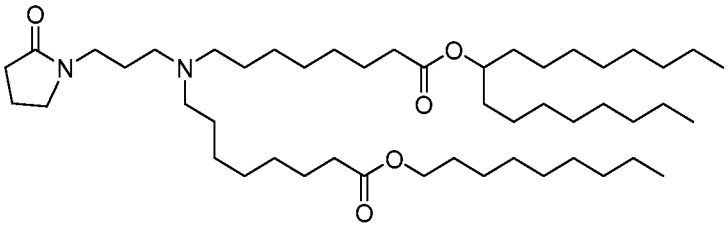
(Соединение 192),



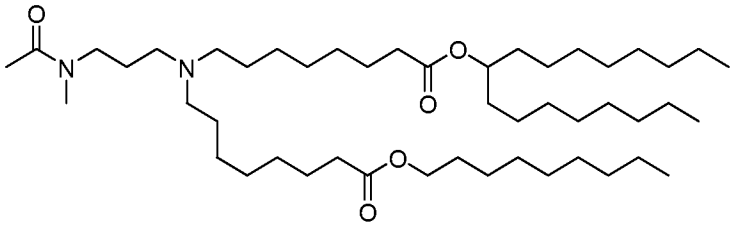
(Соединение 193),



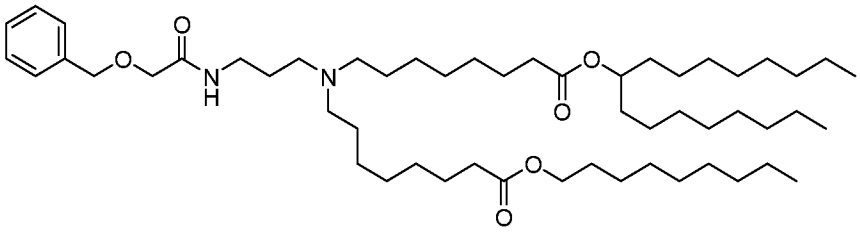
(Соединение 194),



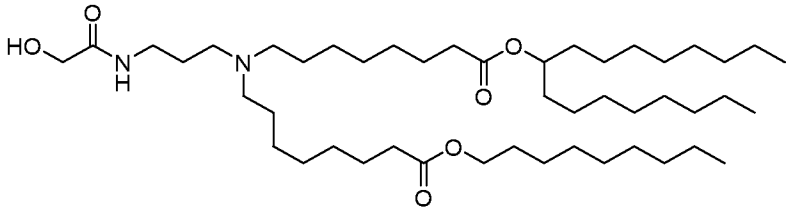
(Соединение 195),



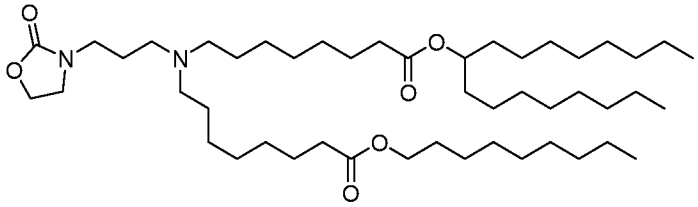
(Соединение 196),



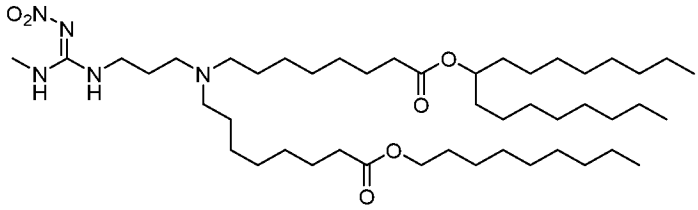
(Соединение 197),



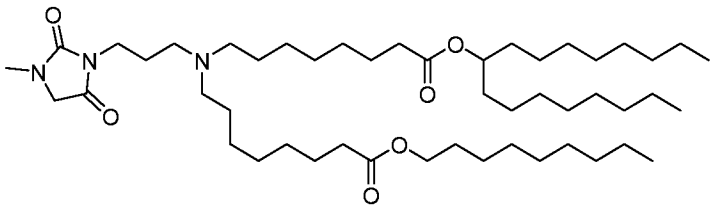
(Соединение 198),



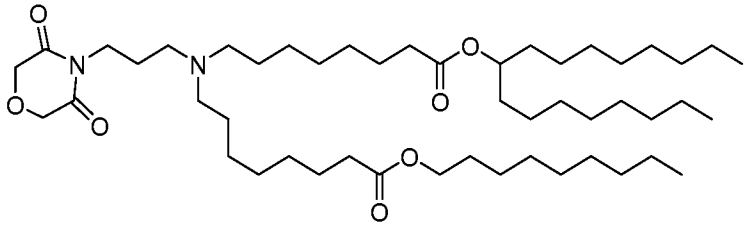
(Соединение 199),



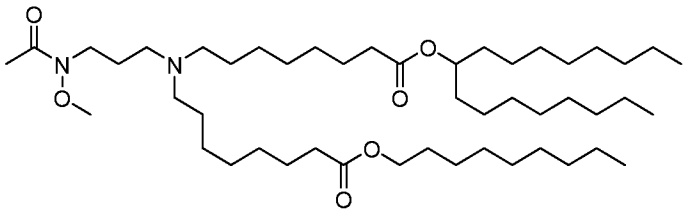
(Соединение 200),



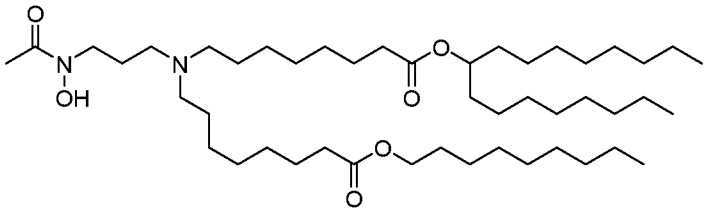
(Соединение 201),



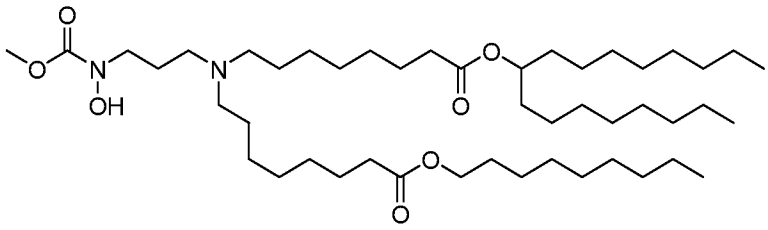
(Соединение 202),



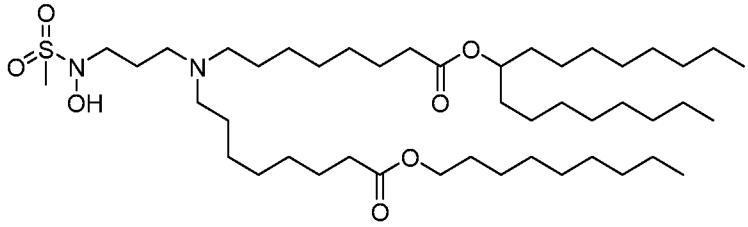
(Соединение 203),



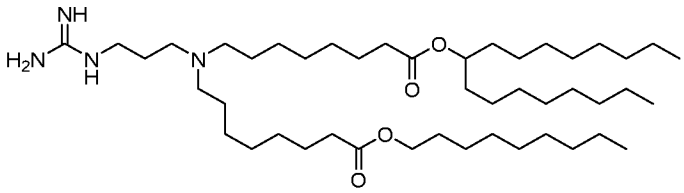
(Соединение 204),



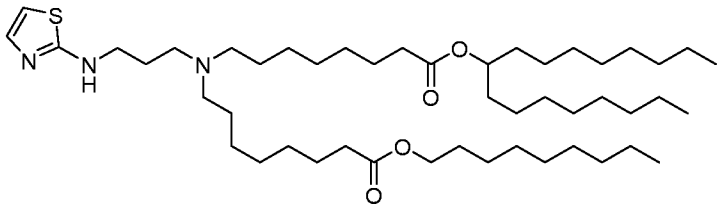
(Соединение 205),



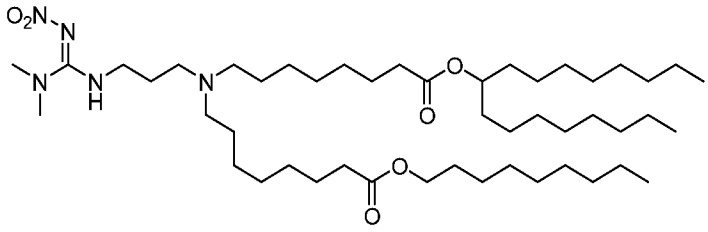
(Соединение 206),



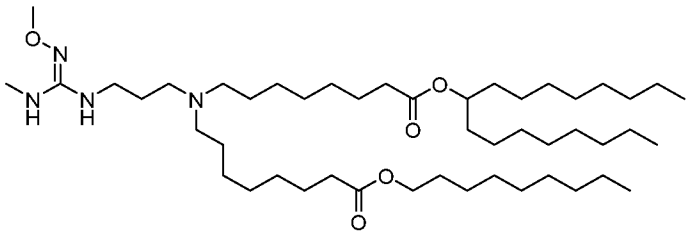
(Соединение 207),



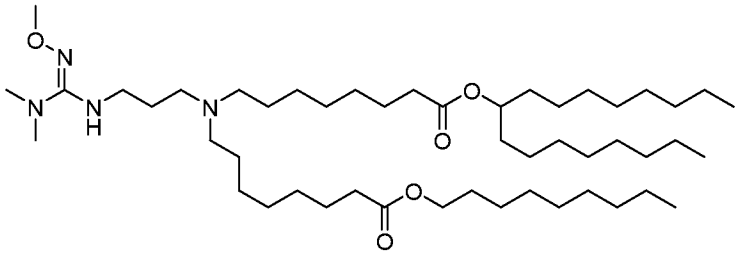
(Соединение 208),



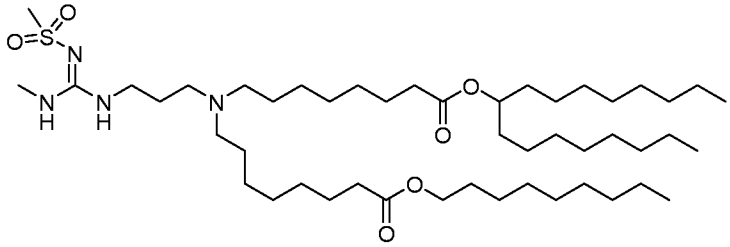
(Соединение 209),



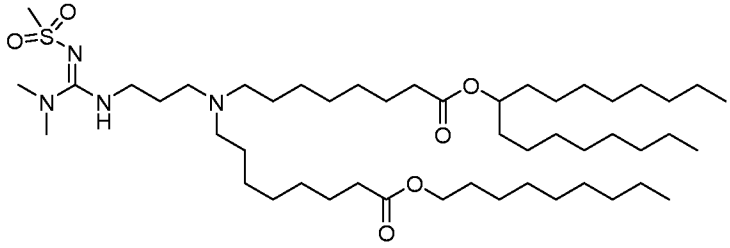
(Соединение 210),



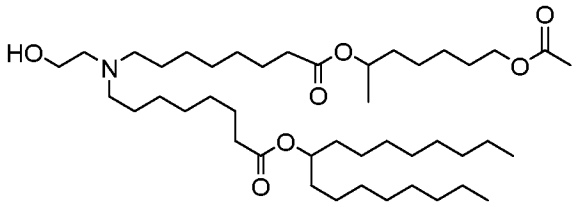
(Соединение 211),



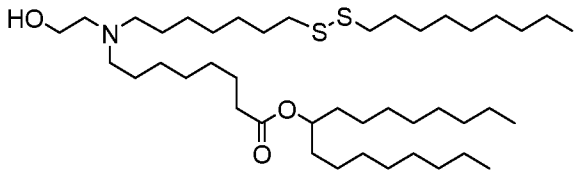
(Соединение 212),



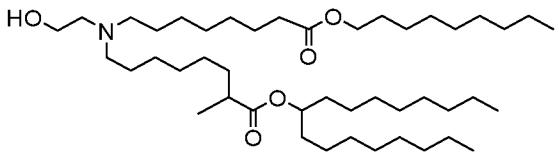
(Соединение 213),



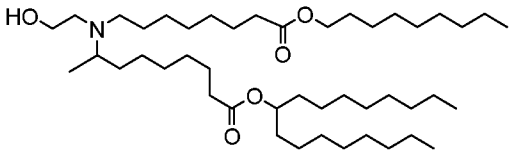
(Соединение 214),



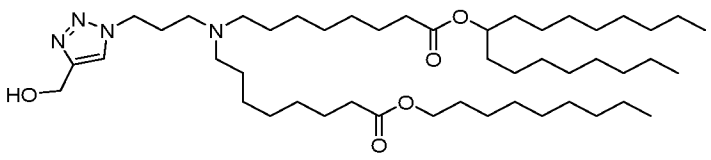
(Соединение 215),



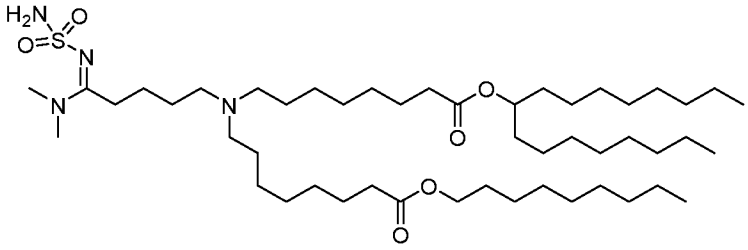
(Соединение 216),



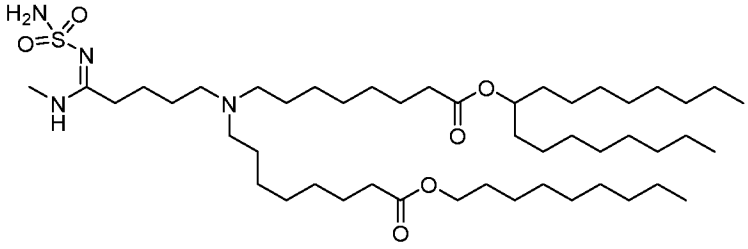
(Соединение 217),



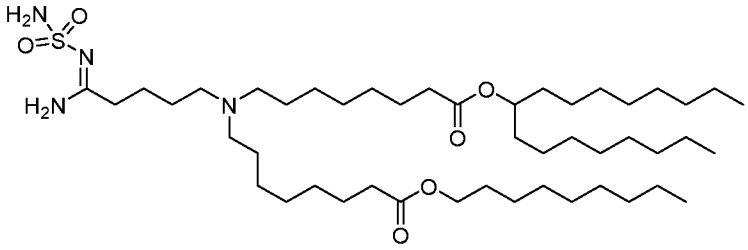
(Соединение 218),



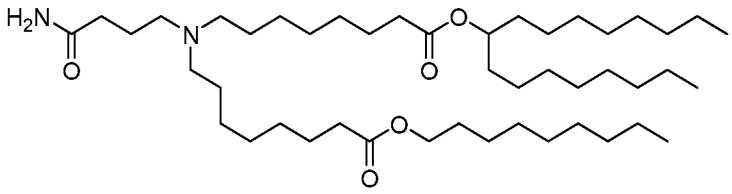
(Соединение 219),



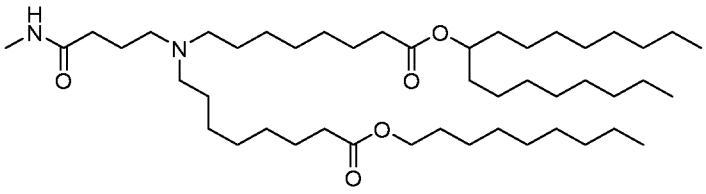
(Соединение 220),



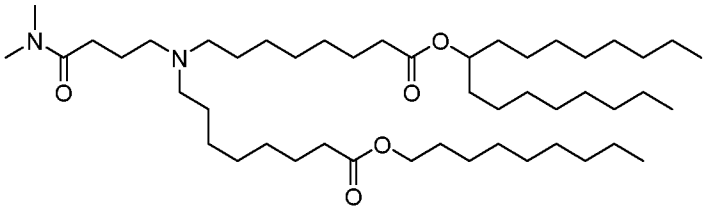
(Соединение 221),



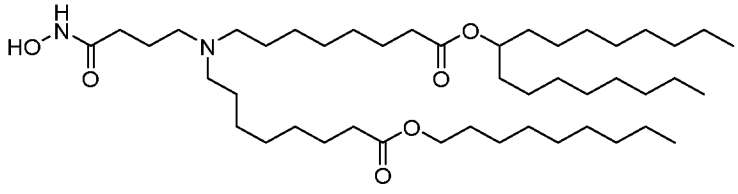
(Соединение 222),



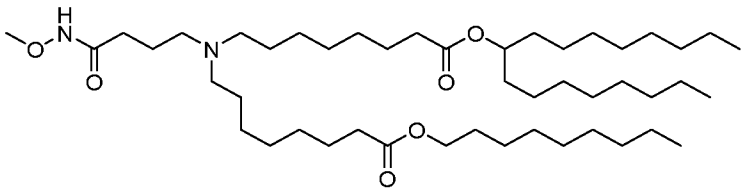
(Соединение 223),



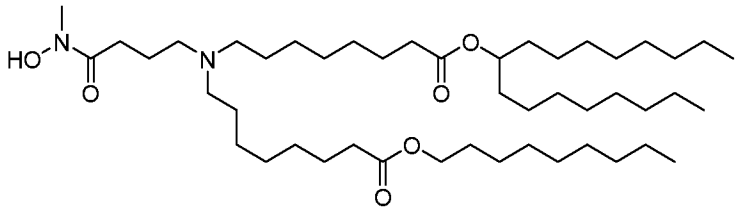
(Соединение 224),



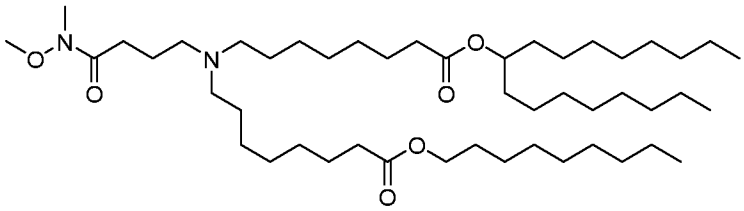
(Соединение 225),



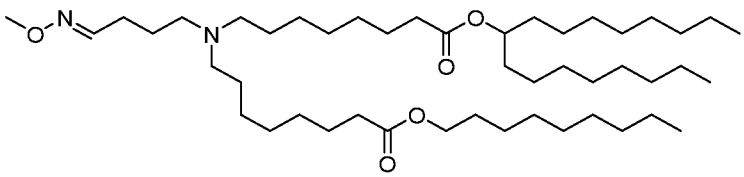
(Соединение 226),



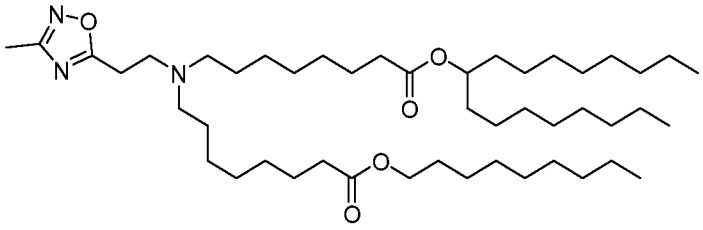
(Соединение 227),



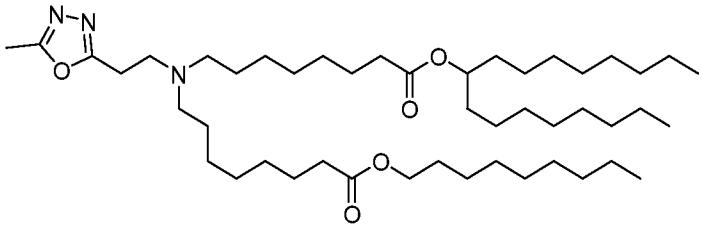
(Соединение 228),



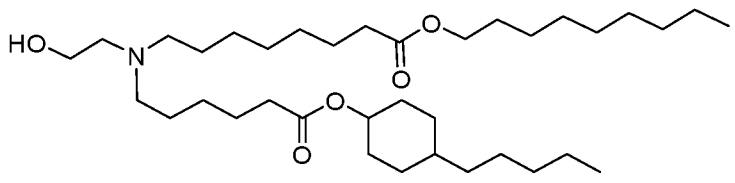
(Соединение 229),



(Соединение 230),



(Соединение 231),



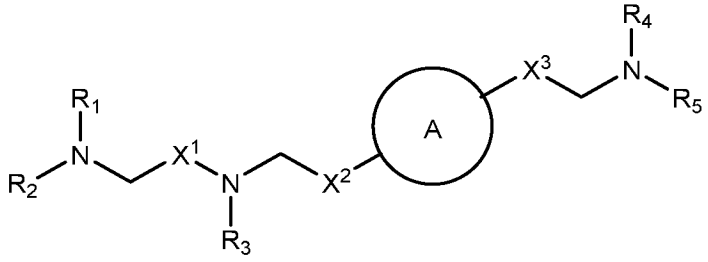
(Соединение 232), а также их соли и изомеры.

В других вариантах осуществления соединение формулы (I) выбирают из группы, состоящей из соединения 1-соединения 147 или их солей или стереоизомеров.

В некоторых вариантах осуществления предложены ионизируемые липиды, содержащие центральный пиперазиновый фрагмент. Описанные

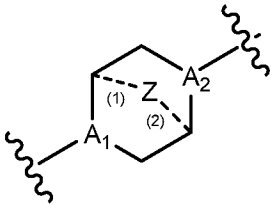
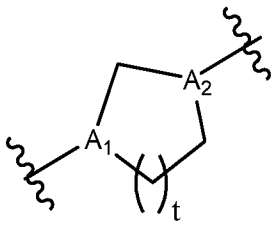
в данном документе липиды могут преимущественно использоваться в композициях липидных наночастиц для доставки терапевтических и/или профилактических агентов в клетки или органы млекопитающих. Например, липиды, описанные в данном документе, имеют небольшую иммуногенность или не имеют ее вообще. Например, описанные в данном документе липидные соединения обладают более низкой иммуногенностью по сравнению с эталонным липидом (например, MC3, KC2 или DLinDMA). Например, композиция, содержащая липид, раскрытый в данном документе, и терапевтический или профилактический агент, имеет повышенный терапевтический индекс по сравнению с соответствующей композицией, которая содержит эталонный липид (например, MC3, KC2 или DLinDMA) и тот же терапевтический или профилактический агент.

В некоторых вариантах осуществления агент доставки включает липидное соединение, имеющее формулу (III)



(III),

или их соли или стереоизомеры, где

кольцо A представляет собой  или  ;

t представляет собой 1 или 2;

$A_1$ и $A_2$ каждый независимо выбирают из CH или N;

Z представляет собой $CH_2$ или отсутствует, при этом когда Z представляет собой $CH_2$, пунктирные линии (1) и (2), каждая, представляют собой одинарную связь; и когда Z отсутствует, пунктирные линии (1) и (2) обе отсутствуют;

$R_1$, $R_2$, $R_3$, $R_4$, и $R_5$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{5-20}$ алкила, $C_{5-20}$ алкенила, R″MR′, R*YR″, YR″, и R*OR″;

каждый M независимо выбирают из группы, состоящей из C(O)O, OC(O), OC(O)O, C(O)N(R′), N(R′)C(O), C(O), C(S), C(S)S, SC(S), CH(OH), P(O)(OR′)O, $S(O)_2$, арильной группы и гетероарильной группы;

$X^1$, $X^2$, и $X^3$ независимо выбирают из группы, состоящей из связи, $CH_2$, $(CH_2)_2$–, CHR, CHY, C(O), C(O)O, OC(O), –C(O)–$CH_2$–, –$CH_2$–C(O)–, C(O)O–$CH_2$, OC(O)–$CH_2$, $CH_2$–C(O)O, $CH_2$–OC(O), CH(OH), C(S), и CH(SH ;

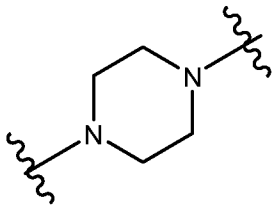
каждый Y независимо представляет собой $C_{3-6}$ карбоцикл;

каждый R* независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-12}$ алкила, $C_{2-12}$ алкенила;

каждый R независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила и $C_{3-6}$ карбоцикла;

каждый R′ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-12}$ алкила, $C_{2-12}$ алкенила и H; и

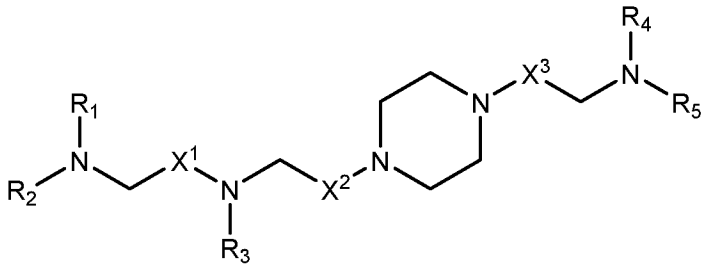
каждый R″ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{3-12}$ алкила, $C_{3-12}$ алкенила,

при этом когда кольцо A представляет собой  , то

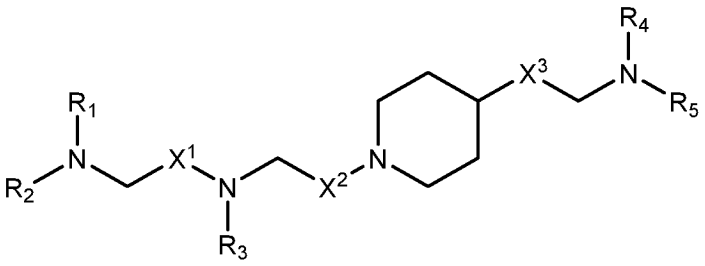
i) по меньшей мере один из $X^1$, $X^2$ и $X^3$ не является $CH_2$; и/или

ii) по меньшей мере один из $R_1$, $R_2$, $R_3$, $R_4$, и $R_5$ представляет собой R″MR′.

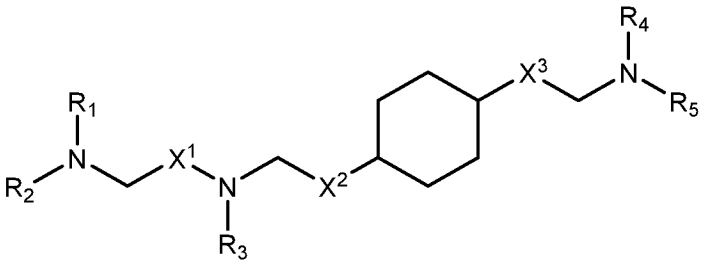
В некоторых вариантах осуществления соединение имеет любую из формул (IIIa1)–(IIIa6):



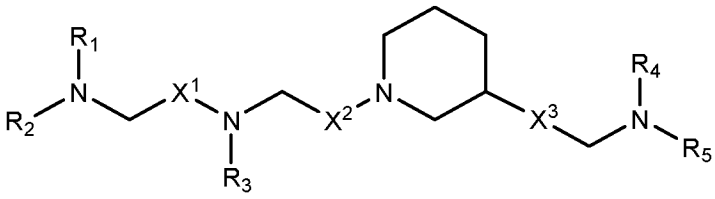
(IIIa1),



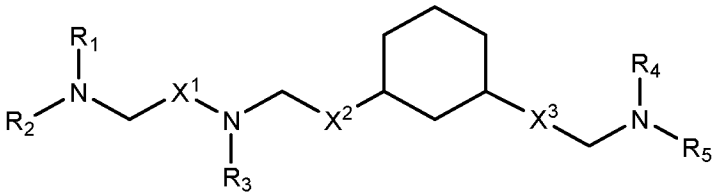
(IIIa2),



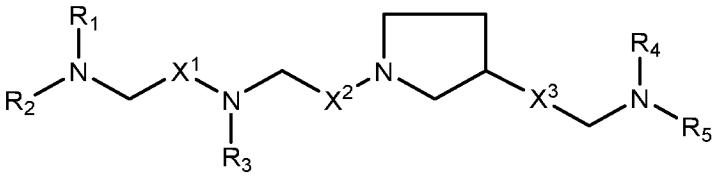
(IIIa3),



(IIIa4),

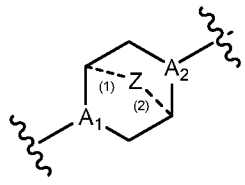


(IIIa5), или

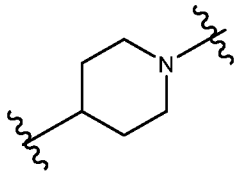
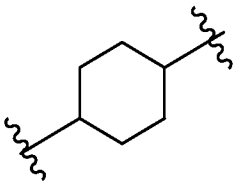


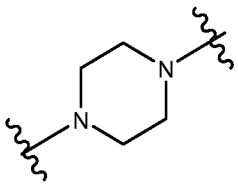
(IIIa6).

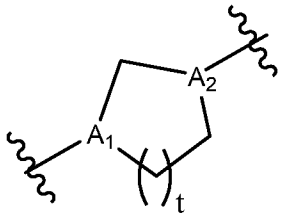
Соединения формулы (III) или любой из (IIIa1)-(IIIa6) включают один или несколько следующих свойств, когда это применимо.

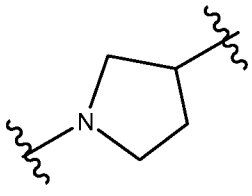
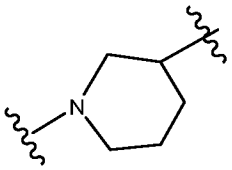
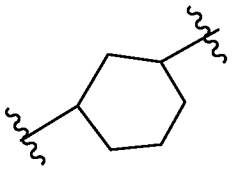
В некоторых вариантах осуществления кольцо A представляет собой  .

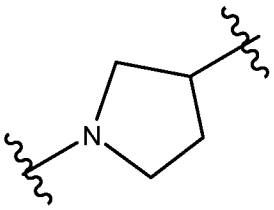
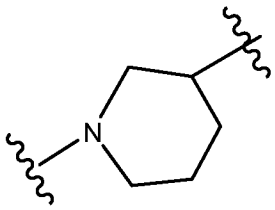
В некоторых вариантах осуществления кольцо A представляет

собой  или  .

В некоторых вариантах осуществления кольцо A представляет собой  .

В некоторых вариантах осуществления кольцо A представляет собой  .

В некоторых вариантах осуществления кольцо A представляет собой  ,  , или  .

В некоторых вариантах осуществления кольцо A представляет собой  или  , где кольцо, в котором атом N связан с $X^2$.

В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой $CH_2$.

В некоторых вариантах осуществления Z отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из $A_1$ и $A_2$ представляет собой N.

В некоторых вариантах осуществления каждый из $A_1$ и $A_2$ представляет собой N.

В некоторых вариантах осуществления каждый из $A_1$ и $A_2$ представляет собой CH.

В некоторых вариантах осуществления $A_1$ представляет собой N и $A_2$ представляет собой CH.

В некоторых вариантах осуществления $A_1$ представляет собой CH и $A_2$ представляет собой N.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из $X^1$, $X^2$ и $X^3$ не является $CH_2$. Например, в определенных вариантах осуществления $X^1$ не является $CH_2$. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из $X^1$, $X^2$ и $X^3$ представляет собой –C(O)–.

В некоторых вариантах осуществления $X^2$ представляет собой –C(O)–, C(O)O, OC(O), $-C(O)-CH_2-$, $-CH_2-C(O)-$, $C(O)O-CH_2$, $OC(O)-CH_2$, $CH_2-C(O)O$, или $CH_2-OC(O)$.

В некоторых вариантах осуществления $X^3$ представляет собой –C(O)–, C(O)O, OC(O), $-C(O)-CH_2-$, $-CH_2-C(O)-$, $C(O)O-CH_2$, $OC(O)-CH_2$, $CH_2-C(O)O$, или $CH_2-OC(O)$. В других вариантах осуществления $X^3$ представляет собой $-CH_2-$.

В некоторых вариантах осуществления $X^3$ представляет собой связь или $-(CH_2)_2-$.

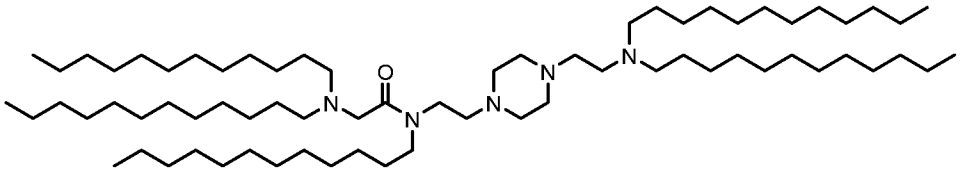
В некоторых вариантах осуществления $R_1$ и $R_2$ являются одинаковыми. В определенных вариантах осуществления $R_1$, $R_2$ и $R_3$ являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления $R_4$ и $R_5$ являются одинаковыми. В определенных вариантах осуществления $R_1$, $R_2$, $R_3$, $R_4$ и $R_5$ являются одинаковыми.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из $R_1$, $R_2$, $R_3$, $R_4$, и $R_5$ представляет собой R″MR′. В некоторых вариантах осуществления по большей мере одно из $R_1$, $R_2$, $R_3$, $R_4$, и $R_5$ представляет собой R″MR′. Например, по меньшей мере один из $R_1$, $R_2$ и $R_3$ может представлять собой R″MR′, и/или по меньшей мере один из $R_4$ и $R_5$ представляет собой R″MR′. В некоторых вариантах по меньшей мере один M представляет собой C(O)O. В некоторых вариантах осуществления каждый M представляет собой C(O)O. В некоторых вариантах по меньшей мере один M представляет собой OC(O). В некоторых вариантах осуществления каждый M представляет собой OC(O). В некоторых вариантах по меньшей мере один M представляет собой OC(O)O. В некоторых вариантах осуществления каждый M представляет собой OC(O)O. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один R″ представляет собой $C_3$ алкил. В определенных вариантах осуществления каждый R″ представляет собой $C_3$ алкил. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один R″ представляет собой $C_5$ алкил. В

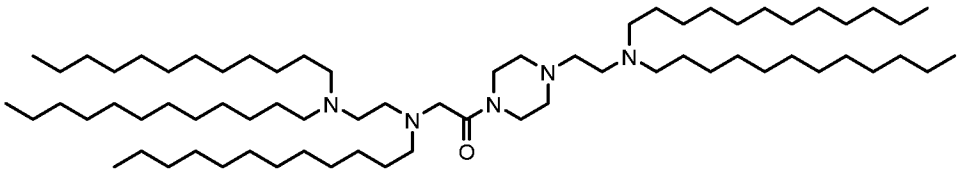
определенных вариантах осуществления каждый R″ представляет собой $C_5$ алкил. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один R″ представляет собой $C_6$ алкил. В определенных вариантах осуществления каждый R″ представляет собой $C_6$ алкил. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один R″ представляет собой $C_7$ алкил. В определенных вариантах осуществления каждый R″ представляет собой $C_7$ алкил. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один R′ представляет собой $C_5$ алкил. В определенных вариантах осуществления каждый R′ представляет собой $C_5$ алкил. В других вариантах осуществления по меньшей мере один R′ представляет собой $C_1$ алкил. В определенных вариантах осуществления каждый R′ представляет собой $C_1$ алкил. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один R′ представляет собой $C_2$ алкил. В определенных вариантах осуществления каждый R′ представляет собой $C_2$ алкил.

В некоторых вариантах по меньшей мере один из $R_1$, $R_2$, $R_3$, $R_4$, и $R_5$ представляет собой $C_{12}$ алкил. В определенных вариантах осуществления $R_1$, $R_2$, $R_3$, $R_4$ и $R_5$ представляют собой $C_{12}$ алкил.

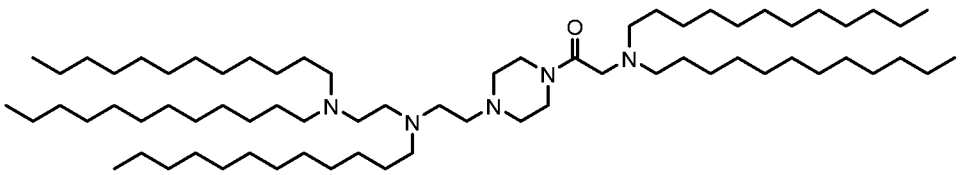
В определенных вариантах осуществления соединение выбирают из группы, состоящей из:



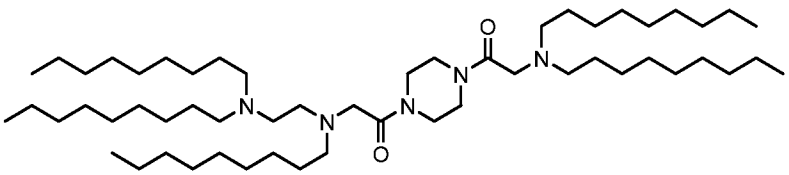
(Соединение 233),



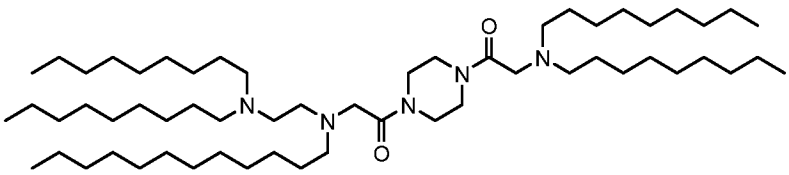
(Соединение 234),



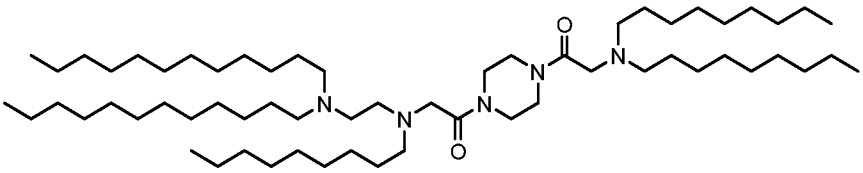
(Соединение 235),



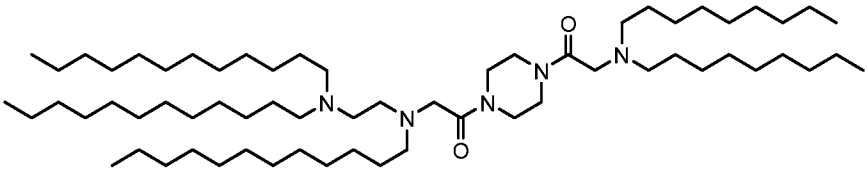
(Соединение 236),



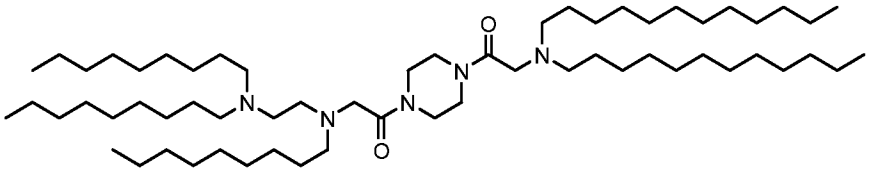
(Соединение 237),



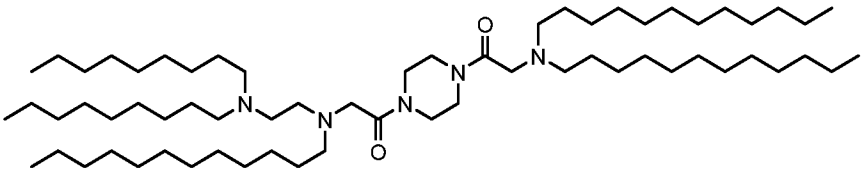
(Соединение 238),



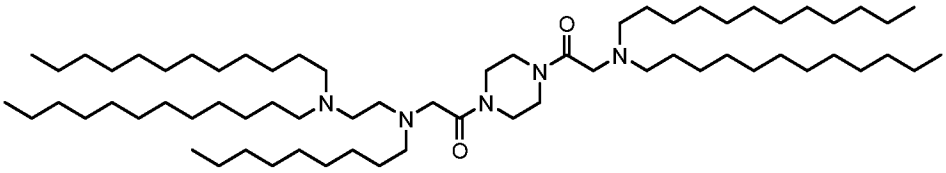
(Соединение 239),



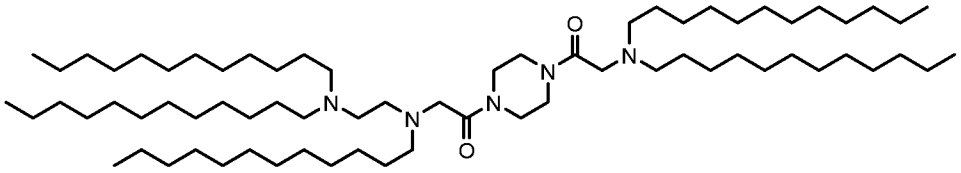
(Соединение 240),



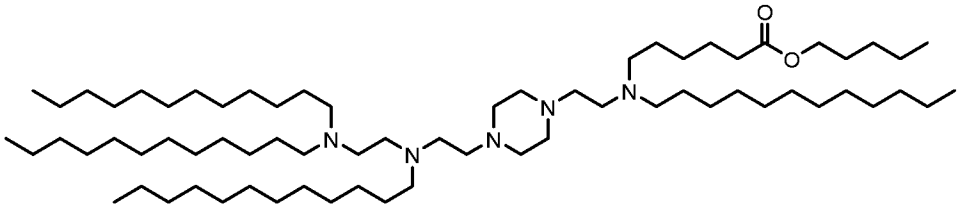
(Соединение 241),



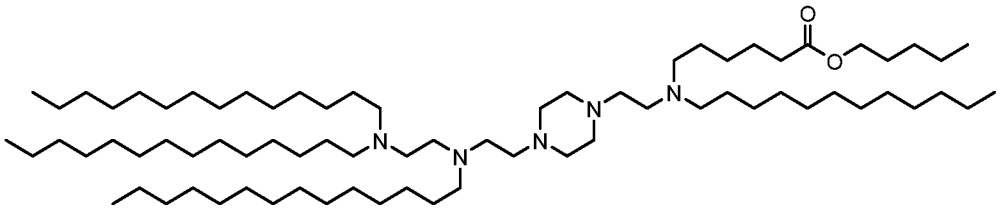
(Соединение 242),



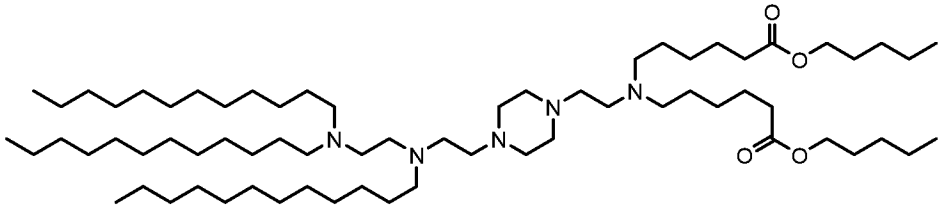
(Соединение 243),



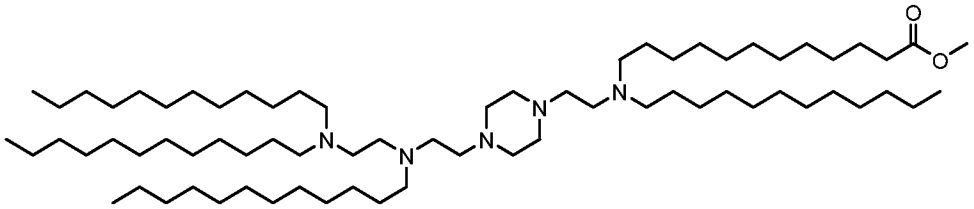
(Соединение 244),



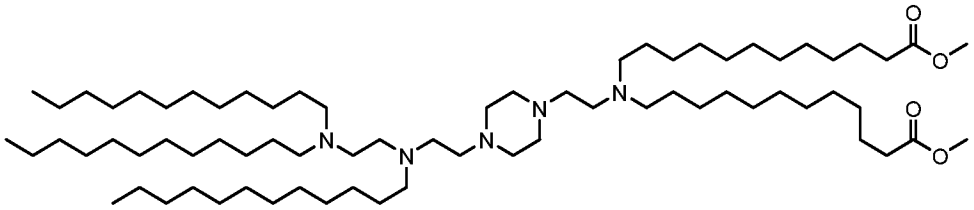
(Соединение 245),



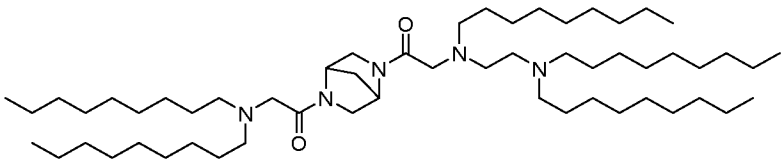
(Соединение 246),



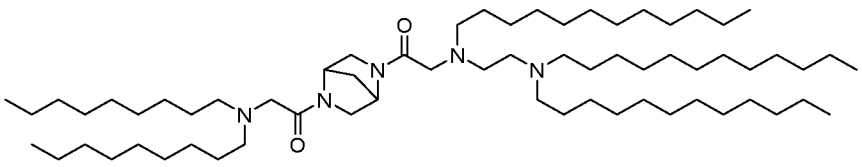
(Соединение 247),



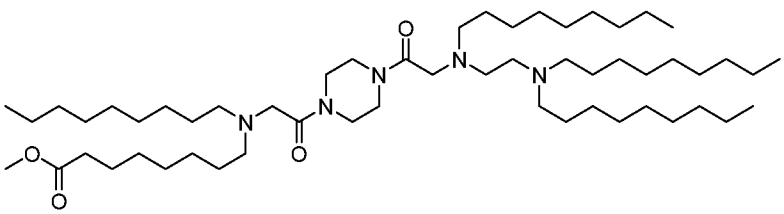
(Соединение 248),



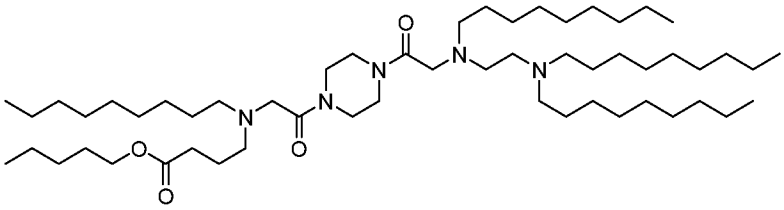
(Соединение 274),



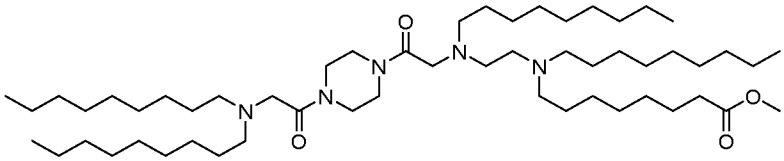
(Соединение 275),



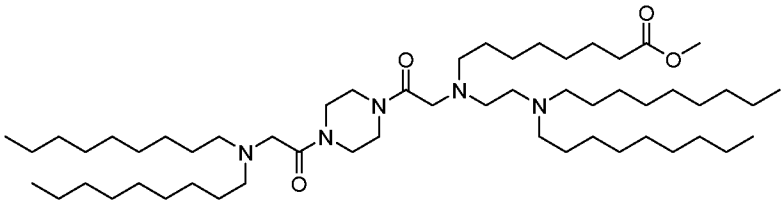
(Соединение 276),



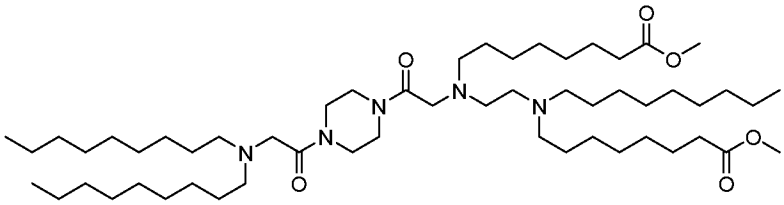
(Соединение 277),



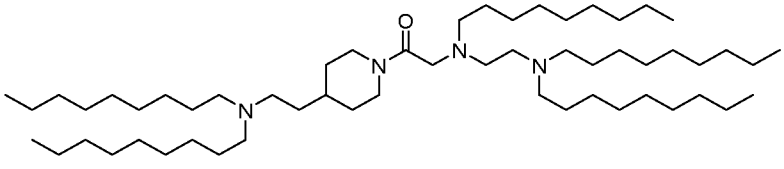
(Соединение 278),



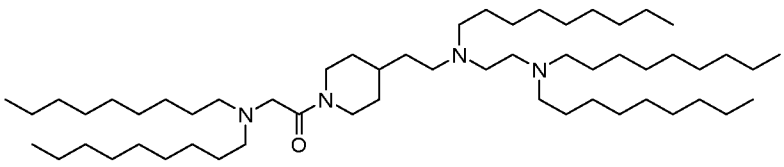
(Соединение 279),



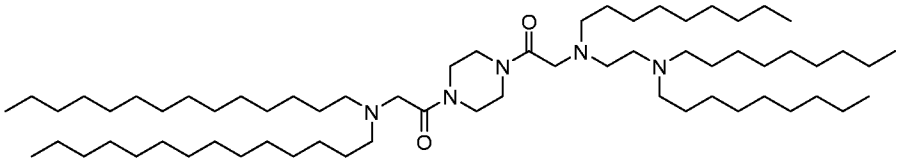
(Соединение 280),



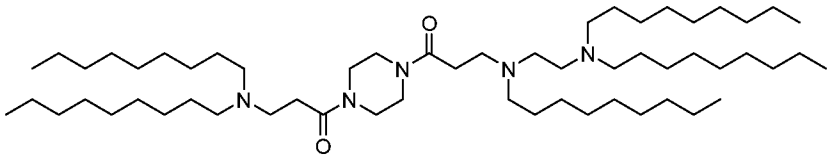
(Соединение 281),



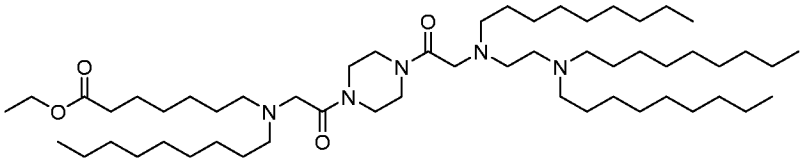
(Соединение 282),



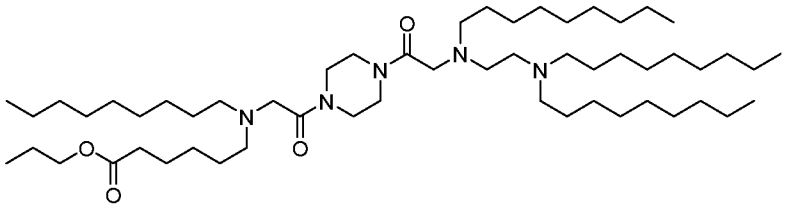
(Соединение 283),



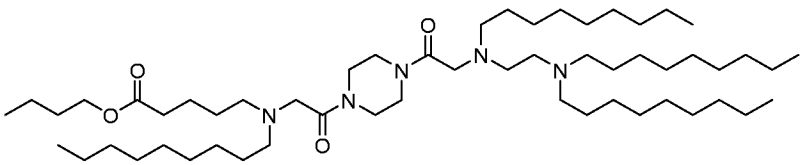
(Соединение 284),



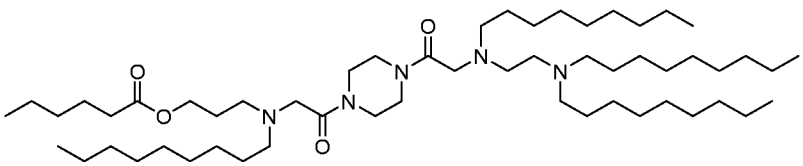
(Соединение 285),



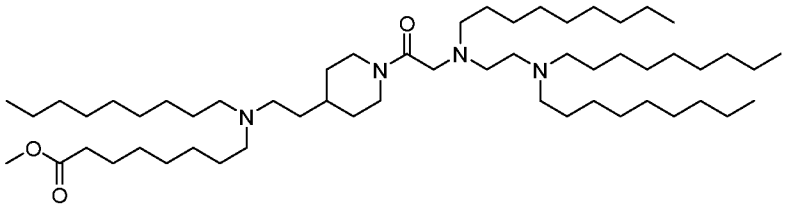
(Соединение 286),



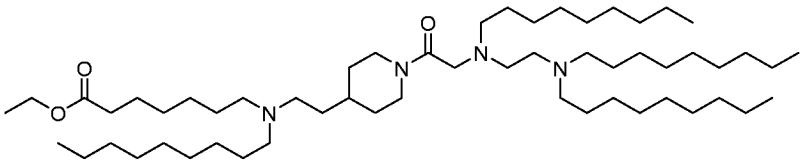
(Соединение 287),



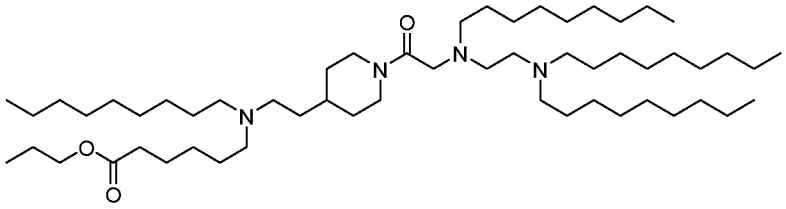
(Соединение 288),



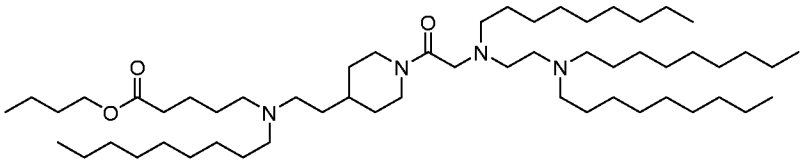
(Соединение 289),



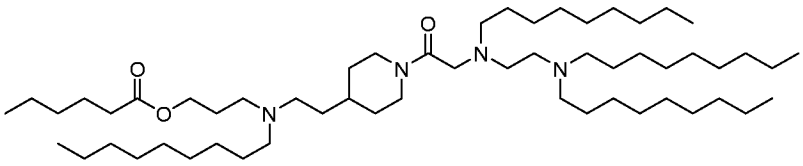
(Соединение 290),



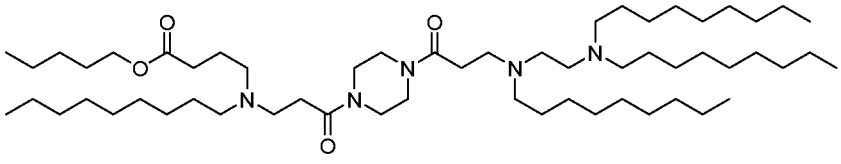
(Соединение 291),



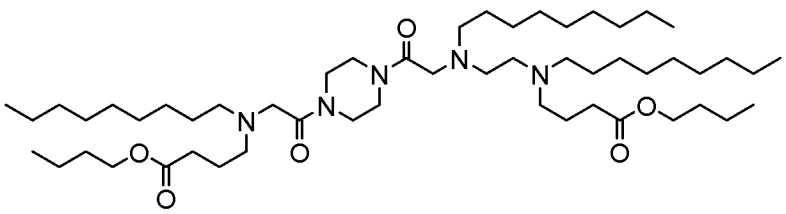
(Соединение 292),



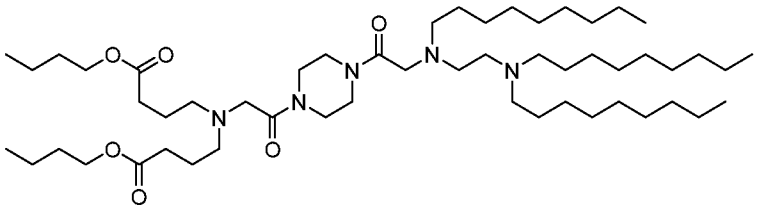
(Соединение 293),



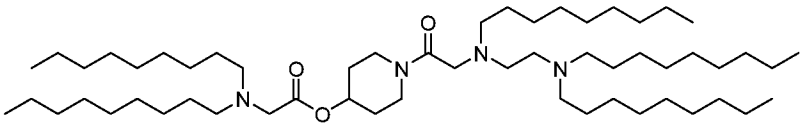
(Соединение 294),



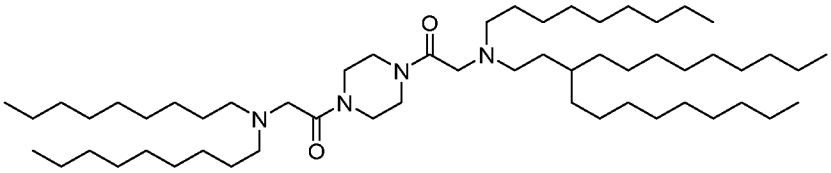
(Соединение 295),



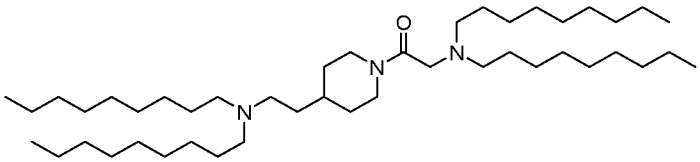
(Соединение 296),



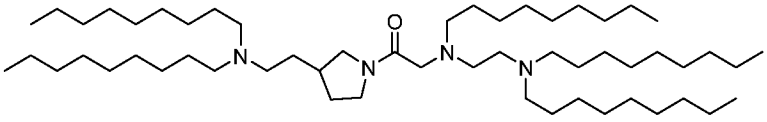
(Соединение 297),



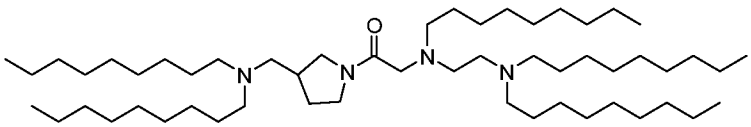
(Соединение 298),



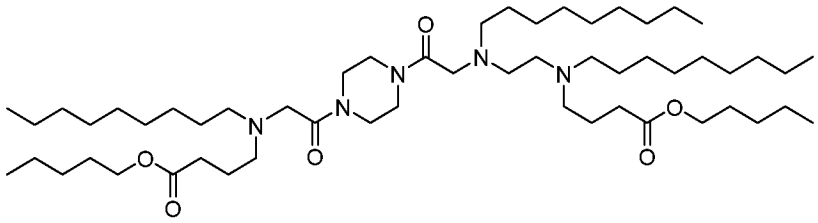
(Соединение 300),



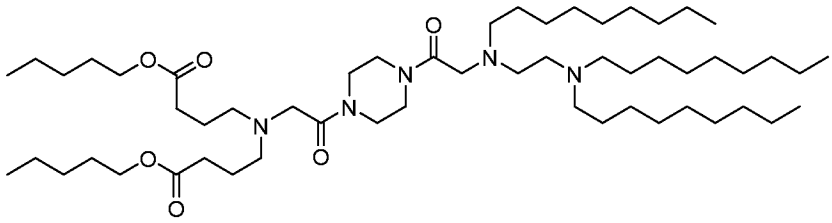
(Соединение 301),



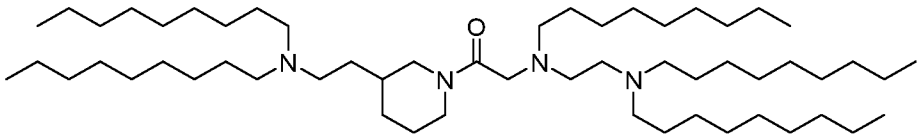
(Соединение 302),



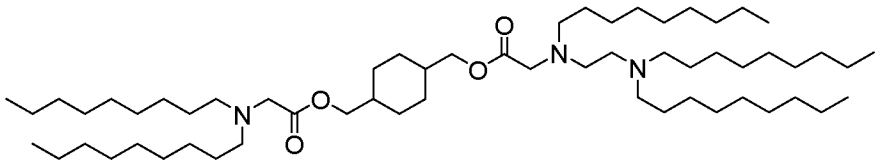
(Соединение 303),



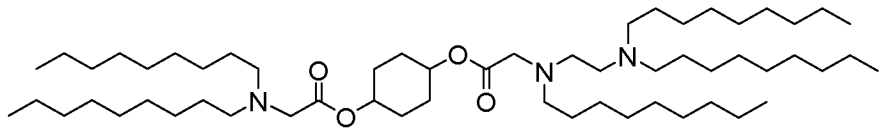
(Соединение 304),



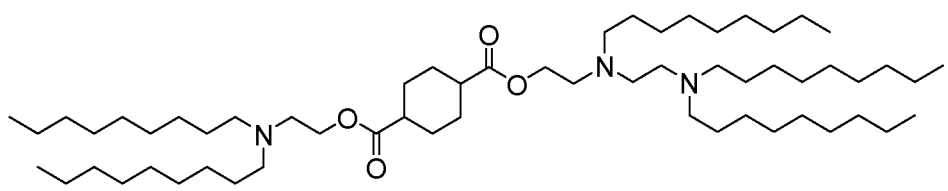
(Соединение 305),



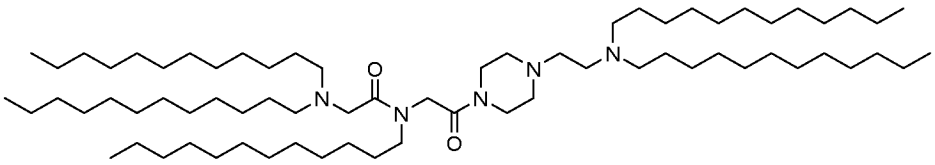
(Соединение 306),



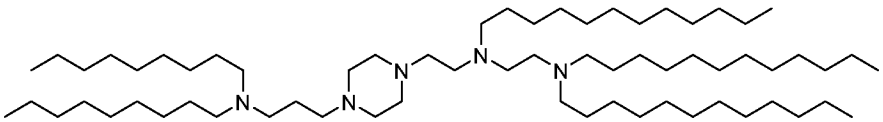
(Соединение 307),



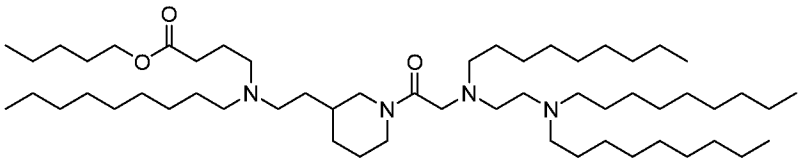
(Соединение 308),



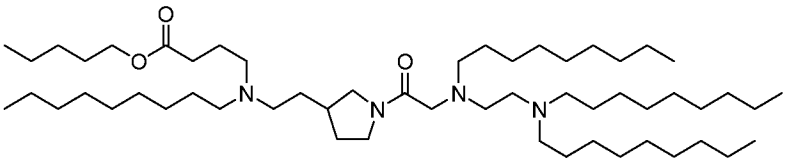
(Соединение 310),



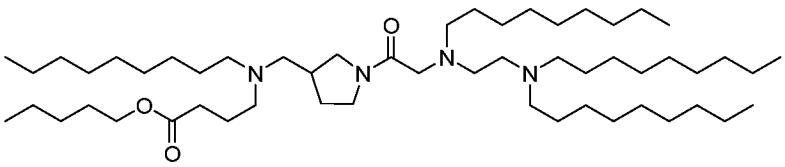
(Соединение 311),



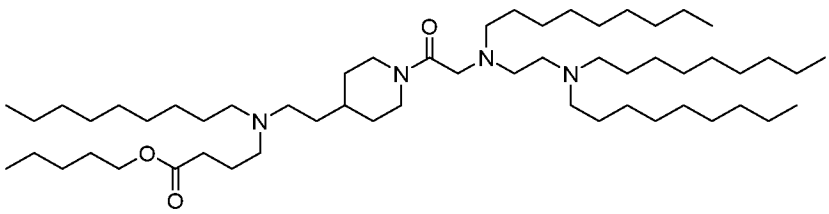
(Соединение 312),



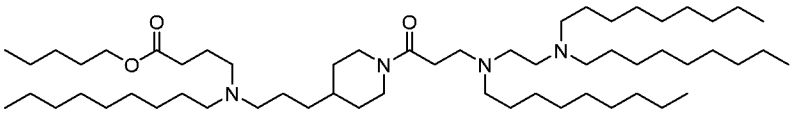
(Соединение 313),



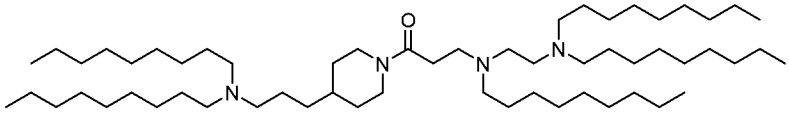
(Соединение 314),



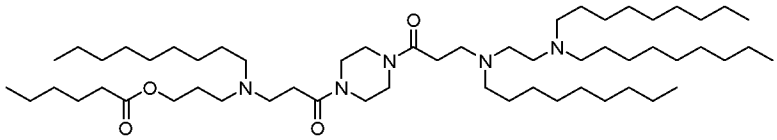
(Соединение 315),



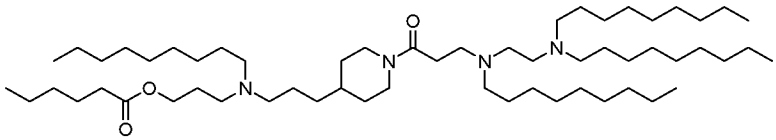
(Соединение 316),



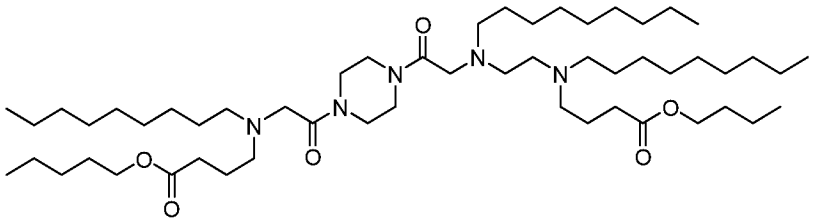
(Соединение 317),



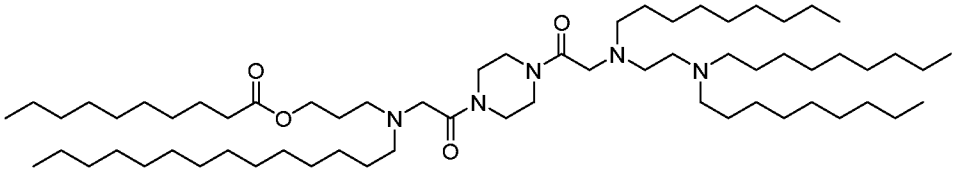
(Соединение 318),



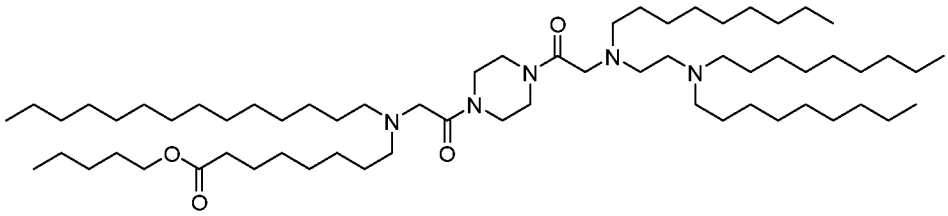
(Соединение 319),



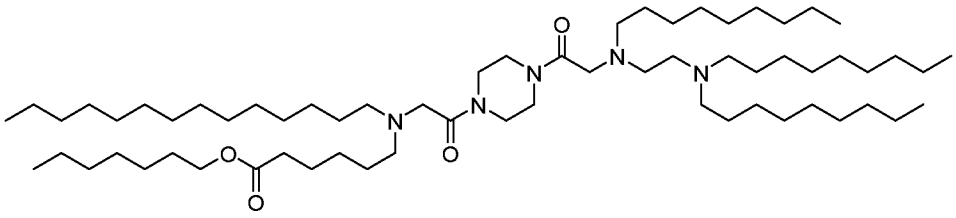
(Соединение 320),



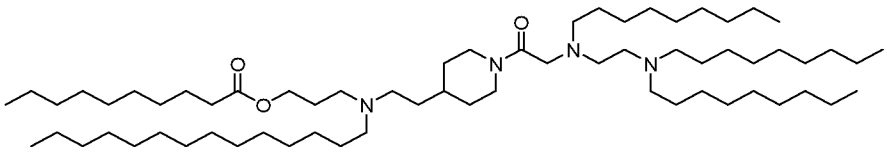
(Соединение 321),



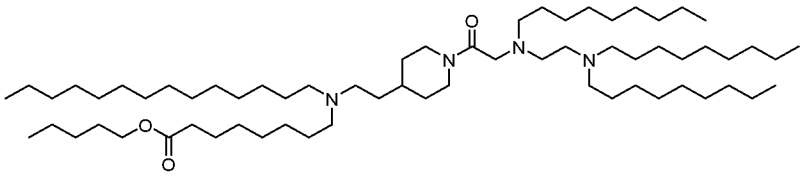
(Соединение 322),



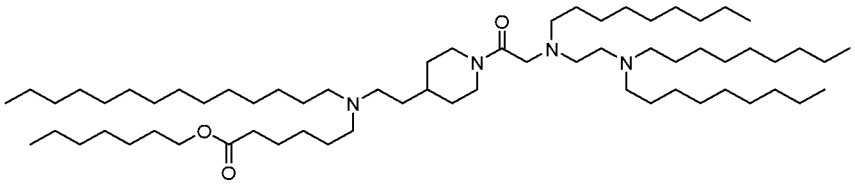
(Соединение 323),



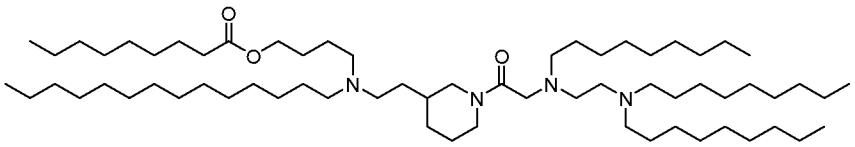
(Соединение 324),



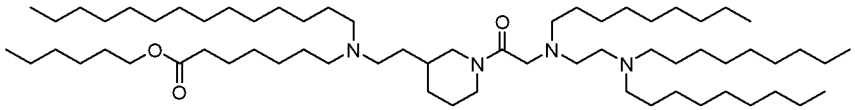
(Соединение 325),



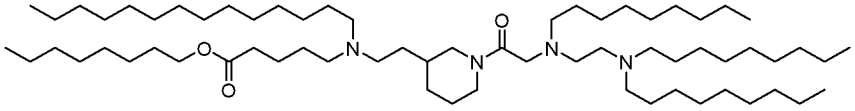
(Соединение 326),



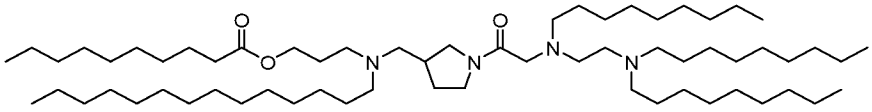
(Соединение 327),



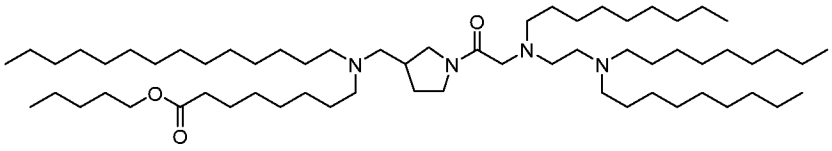
(Соединение 328),



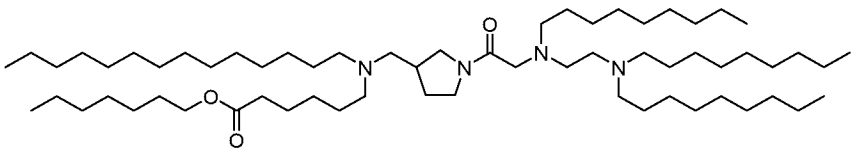
(Соединение 329),



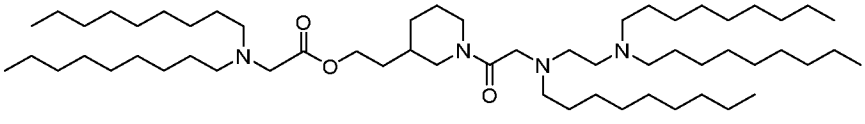
(Соединение 330),



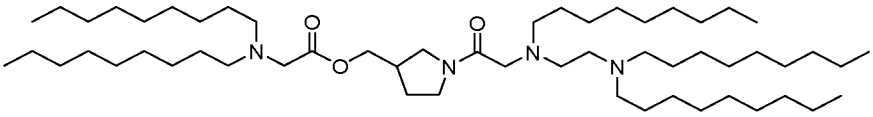
(Соединение 331),



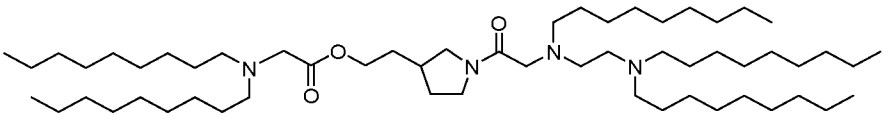
(Соединение 332),



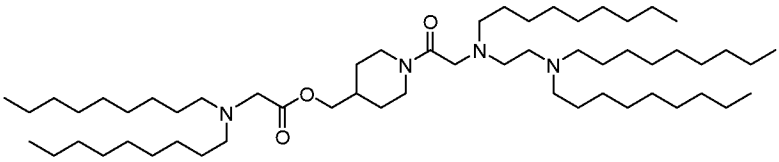
(Соединение 333),



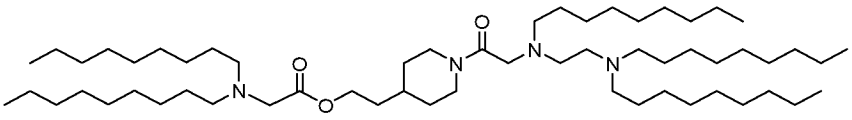
(Соединение 334),



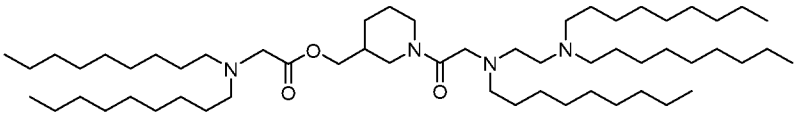
(Соединение 335),



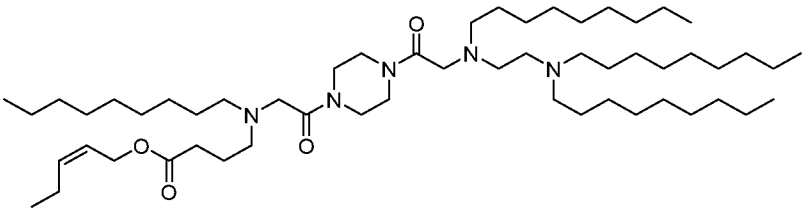
(Соединение 336),



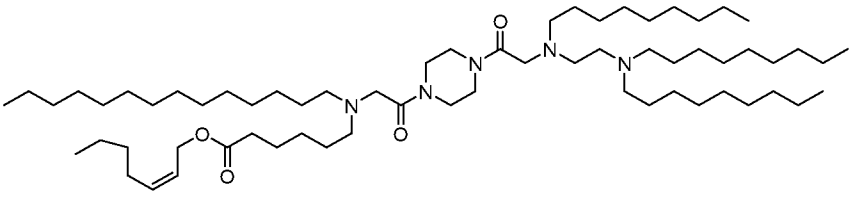
(Соединение 337),



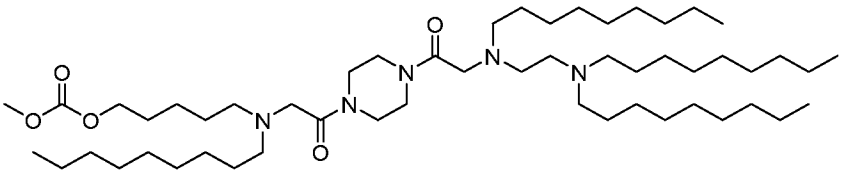
(Соединение 338),



(Соединение 339),



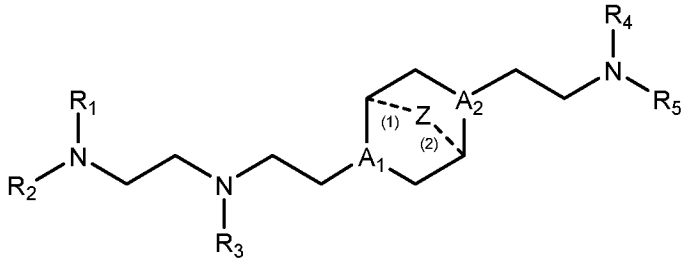
(Соединение 340), и



(Соединение 341).

В некоторых вариантах осуществления агент доставки включает соединение 236.

В некоторых вариантах осуществления агент доставки включает соединение, имеющее формулу (IV)



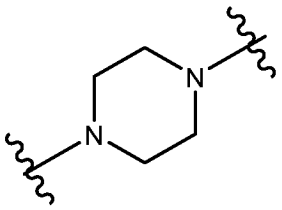
(IV),

или его соль или стереоизомер, где

$A_1$ и $A_2$ каждый независимо выбирают из CH или N, и по меньшей мере один из $A_1$ и $A_2$ представляет собой N;

Z представляет собой $CH_2$ или отсутствует, при этом когда Z представляет собой $CH_2$, пунктирные линии (1) и (2), каждая, представляют собой одинарную связь; и когда Z отсутствует, пунктирные линии (1) и (2) обе отсутствуют;

$R_1$, $R_2$, $R_3$, $R_4$, и $R_5$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{6-20}$ алкила, $C_{620}$ алкенила;

при этом когда кольцо A представляет собой  , то

i) $R_1$, $R_2$, $R_3$, $R_4$ и $R_5$ являются одинаковыми, при этом $R_1$ не является $C_{12}$ алкилом, $C_{18}$ алкилом или $C_{18}$ алкенилом;

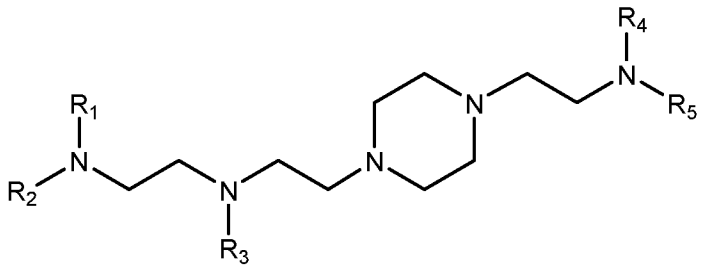
ii) только один из $R_1$, $R_2$, $R_3$, $R_4$ и $R_5$ выбирают из $C_{620}$ алкенила;

iii) по меньшей мере один из $R_1$, $R_2$, $R_3$, $R_4$, и $R_5$ имеет другое число атомов углерода, чем по меньшей мере один другой из $R_1$, $R_2$, $R_3$, $R_4$, и $R_5$;

iv) $R_1$, $R_2$, и $R_3$ выбирают из $C_{620}$ алкенила, а $R_4$ и $R_5$ выбирают из $C_{620}$ алкила; или

v) $R_1$, $R_2$ и $R_3$ выбирают из $C_{620}$ алкила, и $R_4$ и $R_5$ выбирают из $C_{620}$ алкенила.

В некоторых вариантах осуществления соединение имеет формулу (IVa):



(IVa).

Соединения формулы (IV) или (IVa) включают одно или более из следующих свойств, когда это применимо.

В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой $CH_2$.

В некоторых вариантах осуществления Z отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из $A_1$ и $A_2$ представляет собой N.

В некоторых вариантах осуществления каждый из $A_1$ и $A_2$ представляет собой N.

В некоторых вариантах осуществления каждый из $A_1$ и $A_2$ представляет собой CH.

В некоторых вариантах осуществления $A_1$ представляет собой N и $A_2$ представляет собой CH.

В некоторых вариантах осуществления $A_1$ представляет собой CH и $A_2$ представляет собой N.

В некоторых вариантах осуществления $R_1$, $R_2$, $R_3$, $R_4$, и $R_5$ являются одинаковыми и не являются $C_{12}$ алкилом, $C_{18}$ алкилом или $C_{18}$ алкенилом. В некоторых вариантах осуществления $R_1$, $R_2$, $R_3$, $R_4$, и $R_5$ являются одинаковыми и представляют собой $C_9$ алкил или $C_{14}$ алкил.

В некоторых вариантах осуществления только один из $R_1$, $R_2$, $R_3$, $R_4$, и $R_5$выбирают из $C_{620}$ алкенила. В некоторых таких вариантах осуществления $R_1$, $R_2$, $R_3$, $R_4$, и $R_5$ имеют одинаковое количество атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления $R_4$ выбирают из $C_{520}$ алкенила. Например, $R_4$ может представлять собой $C_{12}$ алкенил или $C_{18}$ алкенил.

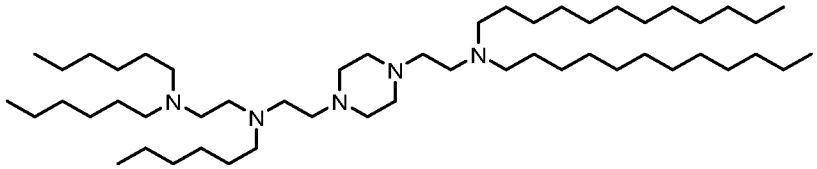
В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из $R_1$, $R_2$, $R_3$, $R_4$, и $R_5$ имеет другое количество атомов углерода, чем по меньшей мере один другой из $R_1$, $R_2$, $R_3$, $R_4$, и $R_5$.

В некоторых вариантах осуществления $R_1$, $R_2$, и $R_3$ выбирают из $C_{620}$ алкенила, а $R_4$ и $R_5$ выбирают из $C_{620}$ алкила. В других вариантах осуществления $R_1$, $R_2$, и $R_3$ выбирают из $C_{620}$ алкила, а $R_4$ и $R_5$ выбирают из $C_{620}$ алкенила. В некоторых вариантах осуществления $R_1$, $R_2$ и $R_3$ имеют одинаковое количество атомов углерода, и/или $R_4$ и $R_5$ имеют одинаковое количество атомов углерода. Например, $R_1$, $R_2$, и $R_3$, или $R_4$ и $R_5$ могут иметь 6, 8, 9, 12, 14 или 18 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления $R_1$, $R_2$, и $R_3$, или $R_4$ и $R_5$ представляют собой $C_{18}$ алкенил (например, линолеил). В некоторых вариантах осуществления $R_1$, $R_2$, и $R_3$, или $R_4$ и $R_5$ представляют собой алкильные группы, содержащие 6, 8, 9, 12 или 14 атомов углерода.

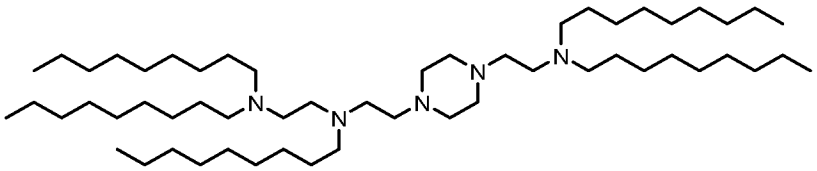
В некоторых вариантах осуществления $R_1$ имеет другое количество атомов углерода, чем $R_2$, $R_3$, $R_4$, и $R_5$. В других вариантах осуществления $R_3$ имеет другое количество атомов

углерода, чем $R_1$, $R_2$, $R_4$, и $R_5$. В дополнительных вариантах осуществления $R_4$ имеет другое количество атомов углерода, чем $R_1$, $R_2$, $R_3$, и $R_5$.

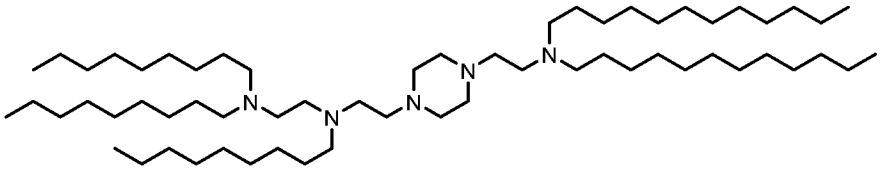
В некоторых вариантах осуществления соединение выбирают из группы, состоящей из:



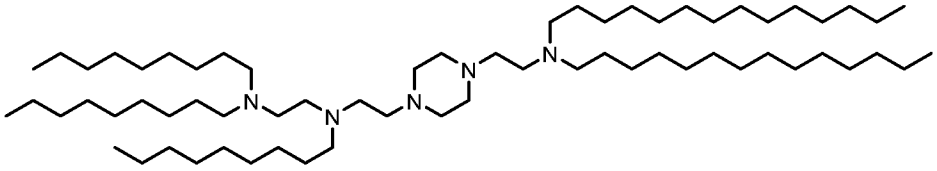
(Соединение 249),



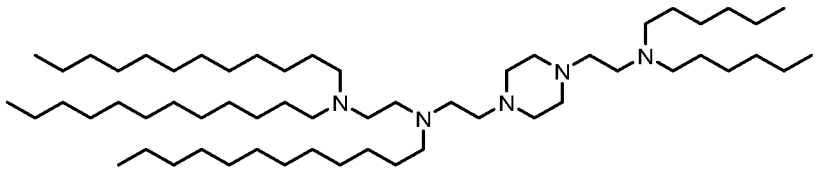
(Соединение 250),



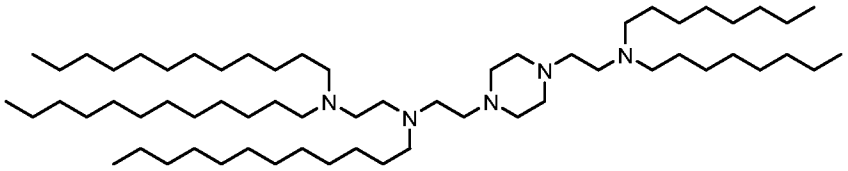
(Соединение 251),



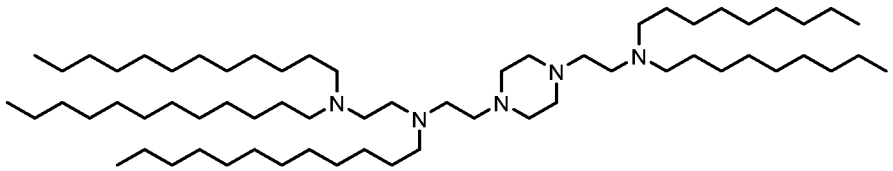
(Соединение 252),



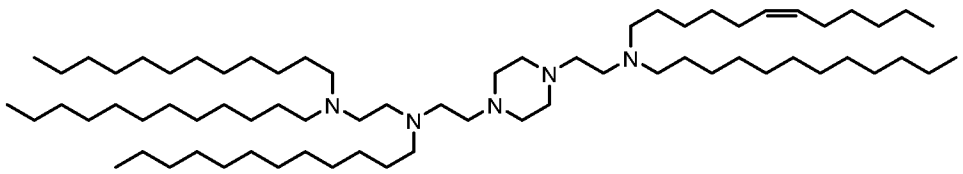
(Соединение 253),



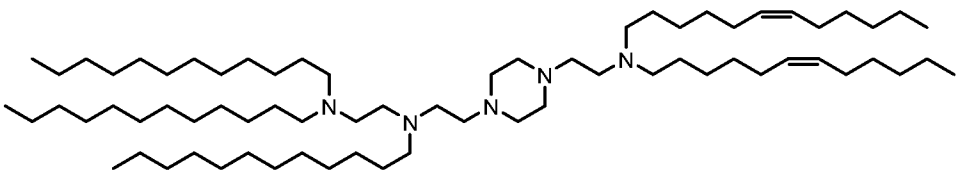
(Соединение 254),



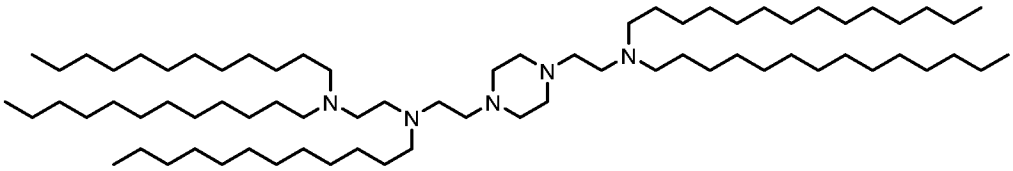
(Соединение 255),



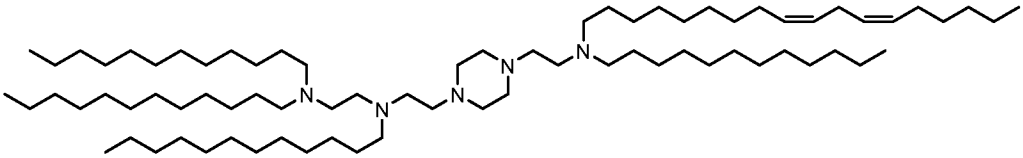
(Соединение 256),



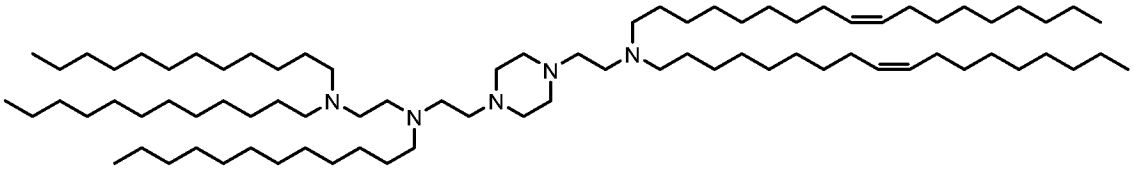
(Соединение 257),



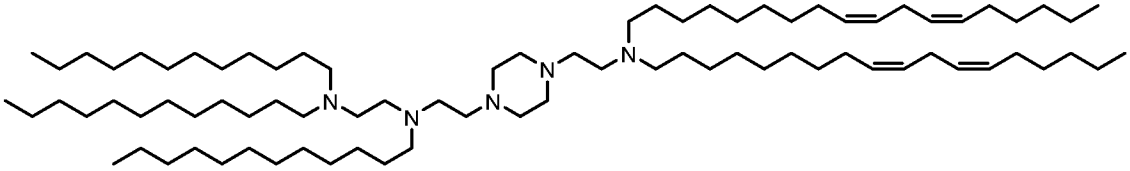
(Соединение 258),



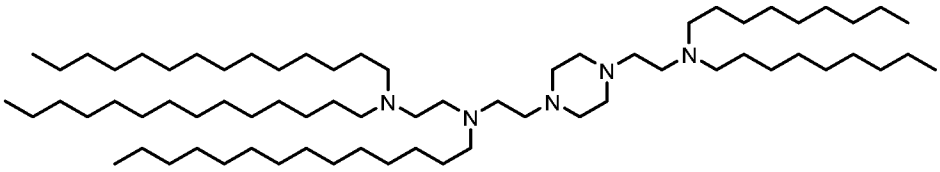
(Соединение 259),



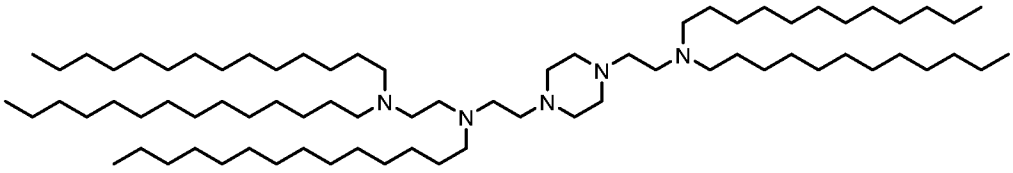
(Соединение 260),



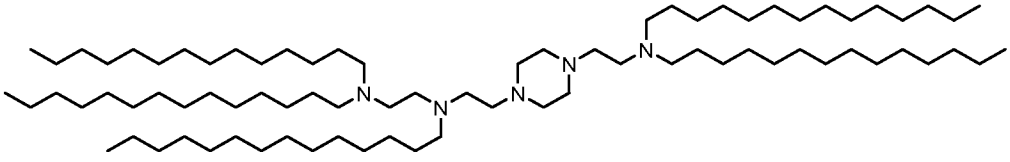
(Соединение 261),



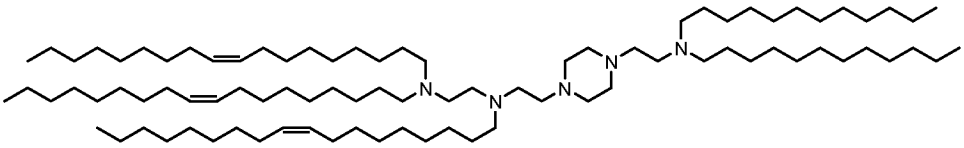
(Соединение 262),



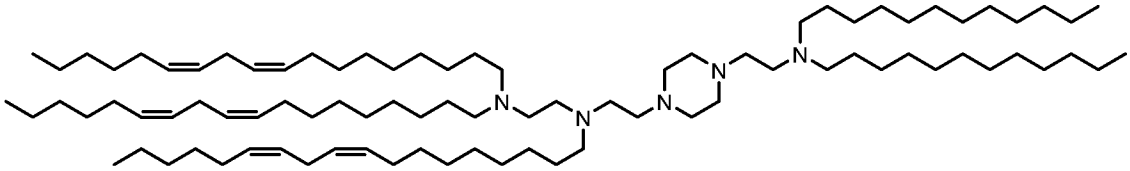
(Соединение 263),



(Соединение 264),

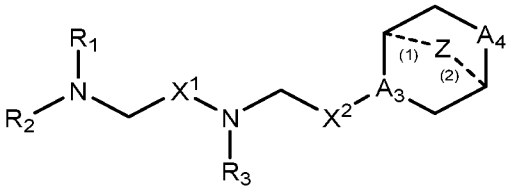


(Соединение 265), и



(Соединение 266).

В других вариантах осуществления агент доставки включает соединение, имеющее формулу (V)



(V),

или его соли или стереоизомеры, в которых

$A_3$ представляет собой CH или N;

$A_4$ представляет собой $CH_2$ или NH; и по меньшей мере один из $A_3$ и $A_4$ представляет собой N или NH;

Z представляет собой $CH_2$ или отсутствует, при этом когда Z представляет собой $CH_2$, пунктирные линии (1) и (2), каждая, представляют собой одинарную связь; и когда Z отсутствует, пунктирные линии (1) и (2) обе отсутствуют;

$R_1$, $R_2$ и $R_3$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{5-20}$ алкила, $C_{5-20}$ алкенила, R″MR′, R*YR″, YR″, и R*OR″;

каждый M независимо выбирают из C(O)O, OC(O), C(O)N(R′), N(R′)C(O), C(O), C(S), C(S)S, SC(S), CH(OH), P(O)(OR′)O, $S(O)_2$, арильной группы и гетероарильной группы;

$X^1$ и $X^2$ независимо выбирают из группы, состоящей из $CH_2$, $(CH_2)_2$, CHR, CHY, C(O), C(O)O, OC(O), $-C(O)-CH_2-$, $-CH_2-C(O)-$, $C(O)OCH_2$, $OC(O)CH_2$, $CH_2-C(O)O$, $CH_2OC(O)$, CH(OH), C(S), и CH(SH) ;

каждый Y независимо представляет собой $C_{3-6}$ карбоцикл;

каждый R* независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-12}$ алкила, $C_{2-12}$ алкенила;

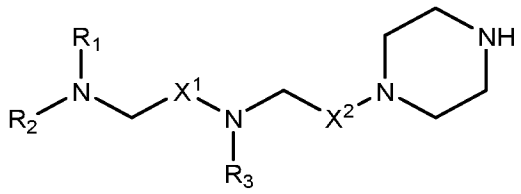
каждый R независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила и $C_{3-6}$ карбоцикла;

каждый R′ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-12}$

алкила, $C_{2-12}$ алкенила и H; и

каждый R" независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{3-12}$ алкила, $C_{3-12}$ алкенила.

В некоторых вариантах осуществления соединение имеет формулу (Va):




(Va).

Соединения формулы (V) или (Va) включают одно или более из следующих свойств, когда это применимо.

В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой $CH_2$.

В некоторых вариантах осуществления Z отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из $A_3$ и $A_4$ представляет собой N или NH.

В некоторых вариантах осуществления $A_3$ представляет собой N и $A_4$ представляет собой NH.

В некоторых вариантах осуществления $A_3$ представляет собой N и $A_4$ представляет собой $CH_2$.

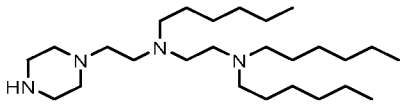
В некоторых вариантах осуществления $A_3$ представляет собой CH и $A_4$ представляет собой NH.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из $X^1$, и $X^2$ не является $CH_2$. Например, в определенных вариантах осуществления $X^1$ не является $CH_2$. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из $X^1$ и $X^2$ представляет собой -C(O)-.

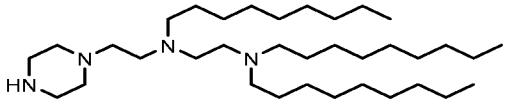
В некоторых вариантах осуществления $X^2$ представляет собой -C(O)-, C(O)O, OC(O), $-C(O)-CH_2-$, $-CH_2-C(O)-$, $C(O)O-CH_2$, $OC(O)-CH_2$, $CH_2-C(O)O$, или $CH_2-OC(O)$.

В некоторых вариантах осуществления $R_1$, $R_2$, и $R_3$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{520}$ алкила и $C_{5-20}$ алкенила. В некоторых вариантах осуществления $R_1$, $R_2$, и $R_3$ являются одинаковыми. В определенных вариантах осуществления $R_1$, $R_2$, и $R_3$ представляют собой $C_6$, $C_9$, $C_{12}$ или $C_{14}$ алкил. В других вариантах осуществления $R_1$, $R_2$, и $R_3$ представляют собой $C_{18}$ алкенил. Например, $R_1$, $R_2$ и $R_3$ могут представлять собой линолеил.

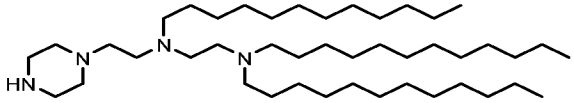
В некоторых вариантах осуществления соединение выбирают из группы, состоящей из:



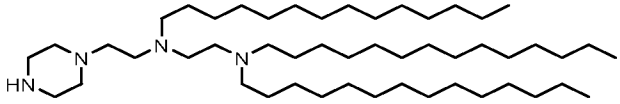
(Соединение 267),



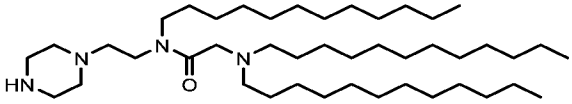
(Соединение 268),



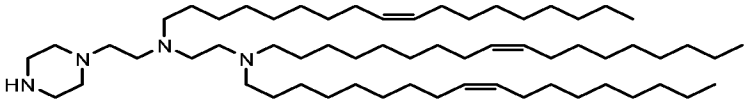
(Соединение 269),



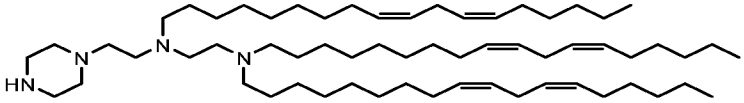
(Соединение 270),



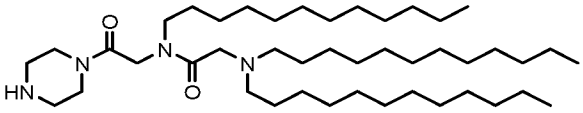
(Соединение 271),



(Соединение 272),

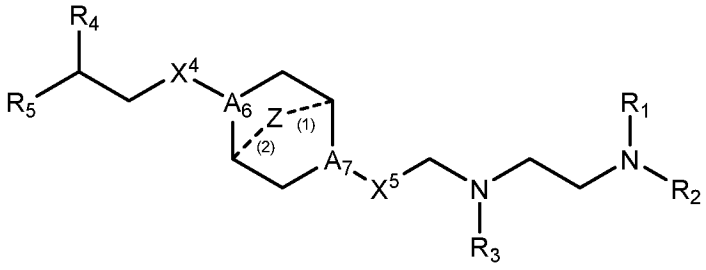


(Соединение 273), и



(Соединение 309).

В других вариантах осуществления агент доставки включает соединение, имеющее формулу (VI):



(VI),

или его соли или стереоизомеры, в которых

$A_6$ и $A_7$ каждый независимо выбирают из CH или N, при этом по меньшей мере один из $A_6$ и $A_7$ представляет собой N;

Z представляет собой $CH_2$ или отсутствует, при этом когда Z представляет собой $CH_2$, пунктирные линии (1) и (2), каждая, представляют собой одинарную связь; и когда Z отсутствует, пунктирные линии (1) и (2) обе отсутствуют;

$X^4$ и $X^5$ независимо выбирают из группы, состоящей из $CH_2$, $CH_2)_2$–, CHR, CHY, C(O), C(O)O, OC(O), –C(O)–$CH_2$–, –$CH_2$–C(O)–,

$C(O)OCH_2$, $OC(O)-CH_2$, $CH_2-C(O)O$, $CH_2-OC(O)$, CH(OH), C(S), и CH(SH);

$R_1$, $R_2$, $R_3$, $R_4$, и $R_5$ каждый независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{5-20}$ алкила, $C_{520}$ алкенила, R″MR′, R*YR″, YR″, и R*OR″;

каждый M независимо выбирают из группы, состоящей из C(O)O, OC(O), C(O)N(R′), N(R′)C(O), C(O), C(S), C(S)S, SC(S), CH(OH), P(O)(OR′)O, $S(O)_2$ арильной группы и гетероарильной группы;

каждый Y независимо представляет собой $C_{3-6}$ карбоцикл;

каждый R* независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-12}$ алкила, $C_{2-12}$ алкенила;

каждый R независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-3}$ алкила и $C_{3-6}$ карбоцикла;

каждый R′ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{1-12}$ алкила, $C_{2-12}$ алкенила и H; и

каждый R″ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{3-12}$ алкила, $C_{3-12}$ алкенила.

В некоторых вариантах осуществления $R_1$, $R_2$, $R_3$, $R_4$, и $R_5$ независимо выбирают из группы, состоящей из $C_{6-20}$ алкила, $C_{620}$ алкенила.

В некоторых вариантах осуществления $R_1$ и $R_2$ являются одинаковыми. В определенных вариантах осуществления $R_1$, $R_2$ и $R_3$ являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления $R_4$ и $R_5$ являются одинаковыми. В определенных вариантах осуществления $R_1$, $R_2$, $R_3$, $R_4$ и $R_5$ являются одинаковыми.

В некоторых вариантах по меньшей мере один из $R_1$, $R_2$, $R_3$, $R_4$, и $R_5$ представляет собой $C_{9-12}$ алкил. В некоторых вариантах осуществления каждый из $R_1$, $R_2$, $R_3$, $R_4$, или $R_5$независимо представляет собой $C_9$, $C_{12}$ или $C_{14}$ алкил. В некоторых вариантах осуществления каждый из $R_1$, $R_2$, $R_3$, $R_4$, и $R_5$ представляет собой $C_9$ алкил.

В некоторых вариантах осуществления $A_6$ представляет собой N и $A_7$ представляет собой N. В некоторых вариантах осуществления $A_6$ представляет собой CH и $A_7$ представляет собой N.

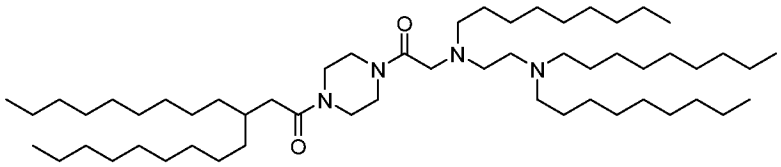
В некоторых вариантах осуществления $X^4$ представляет собой $CH_2$ и $X^5$ представляет собой -C(O)-. В некоторых вариантах осуществления $X^4$ и $X^5$ представляют собой -C(O)-.

В некоторых вариантах осуществления, когда $A_6$ представляет собой N и $A_7$ представляет собой N, по меньшей мере один из $X^4$ и $X^5$ не является $CH_2$, например, по меньшей мере один из $X^4$ и $X^5$ представляет собой -C(O)-. В некоторых вариантах осуществления,

когда $A_6$ представляет собой N и $A_7$ представляет собой N, по меньшей мере один из $R_1$, $R_2$, $R_3$, $R_4$ и $R_5$ представляет собой R″MR′.

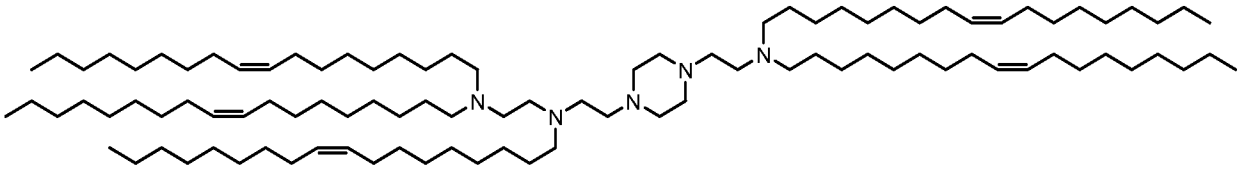
В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из $R_1$, $R_2$, $R_3$, $R_4$, и $R_5$ не является R″MR′.

В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой



(Соединение 299).

В других вариантах осуществления агент доставки включает соединение, имеющее формулу:



(Соединение 342).

Аминные фрагменты липидных соединений, раскрытых в данном документе, могут быть протонированы при определенных условиях. Например, центральный аминный фрагмент липида в соответствии с формулой (I) обычно протонируется (то есть положительно заряжен) при pH ниже pKa аминогруппы и по существу не заряжается при pH выше pKa. Такие липиды могут быть отнесены к ионизируемым аминолипидам.

В одном конкретном варианте осуществления ионизируемый аминолипид представляет собой соединение 18. В другом варианте осуществления ионизируемый аминолипид представляет собой соединение 236.

В некоторых вариантах осуществления количество ионизируемого аминолипида, например, соединения формулы (I), составляет от около 1 до 99 мол.% в липидной композиции.

В одном варианте осуществления количество ионизируемого аминолипида, например, соединения формулы (I), составляет по меньшей мере около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93,

94, 95, 96, 97, 98 или 99 мол.% в липидной композиции.

В одном варианте осуществления количество ионизируемого аминолипида, например, соединения формулы (I), находится в диапазоне от около 30 мол.% до около 70 мол.%, от около 35 мол.% до около 65 мол.%, от около 40 мол.% до около 60 мол.% и от около 45 мол.% до около 55 мол.% в липидной композиции.

В одном конкретном варианте осуществления количество ионизируемого аминолипида, например, соединения формулы (I), составляет около 50 мол.% в липидной композиции.

В дополнение к ионизируемому аминолипиду, раскрытому в данном документе, например соединению формулы (I), липидная композиция фармацевтических композиций, раскрытых в данном документе, может содержать дополнительные компоненты, такие как фосфолипиды, структурные липиды, ПЭГ-липиды и любую их комбинацию.

**b. Фосфолипиды**

Липидная композиция фармацевтической композиции, раскрытая в данном документе, может содержать один или более фосфолипидов, например, один или более насыщенных или (поли)ненасыщенных фосфолипидов или их комбинацию. Как правило, фосфолипиды содержат фосфолипидный фрагмент и один или более фрагментов жирных кислот.

Фосфолипидный фрагмент может быть выбран, например, из неограничивающей группы, состоящей из фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилглицерина, фосфатидилсерина, фосфатидовой кислоты, 2-лизофосфатидилхолина и сфингомиелина.

Фрагмент жирной кислоты может быть выбран, например, из неограничивающей группы, состоящей из лауриновой кислоты, миристиновой кислоты, миристолевой кислоты, пальмитиновой кислоты, пальмитолеиновой кислоты, стеариновой кислоты, олеиновой кислоты, линолевой кислоты, альфа-линоленовой кислоты, эруковой кислоты, фитановой кислоты, арахидиновой кислоты, арахидоновой кислоты, эйкозапентаеновой кислоты, бегеновой кислоты, докозапентаеновой кислоты и докозагексаеновой кислоты.

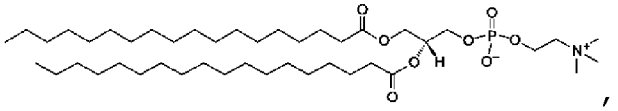
Конкретные фосфолипиды могут облегчать слияние с мембраной. Например, катионный фосфолипид может взаимодействовать с одним или более отрицательно заряженными фосфолипидами мембраны (например, клеточной или внутриклеточной мембраны). Слияние фосфолипида с мембраной может позволить одному или более элементам (например, терапевтическому агенту)

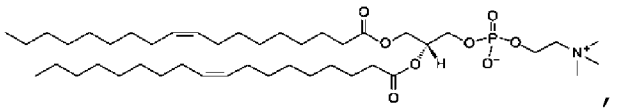
липидсодержащей композиции (например, LNP) проходить через мембрану, обеспечивая, например, доставку одного или более элементов к целевой ткани.

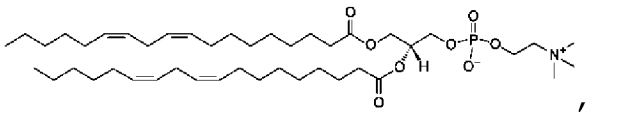
Также предусмотрены неприродные виды фосфолипидов, включая природные виды с модификациями и заменами, включая разветвление, окисление, циклизацию и алкины. Например, фосфолипид может быть функционализован или перекрестно-сшит с одним или более алкинами (например, алкенильной группой, в которой одна или более двойных связей заменены тройной связью). При соответствующих условиях реакции алкиновая группа может подвергаться катализируемой медью циклоприсоединению при воздействии азида. Такие реакции могут быть полезны для функционализации липидного бислоя композиции наночастиц для облегчения проникновения через мембрану или клеточного распознавания или для конъюгации композиции наночастиц с полезным компонентом, таким как нацеливающий фрагмент или фрагмент для визуализации (например, краситель).

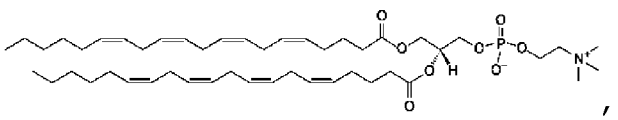
Фосфолипиды включают, но не ограничиваются ими, глицерофосфолипиды, такие как фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламины, фосфатидилсерины, фосфатидилинозитолы, фосфатидилглицерины и фосфатидные кислоты. Фосфолипиды также включают фосфосфинголипид, такой как сфингомиелин.

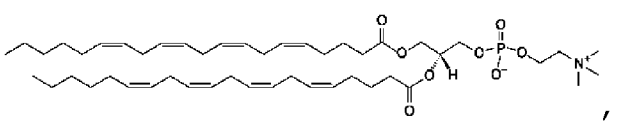
Примеры фосфолипидов включают, но не ограничиваются ими, следующее:

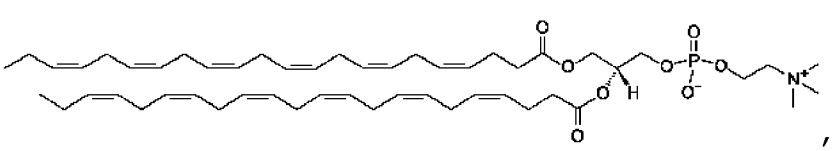

,

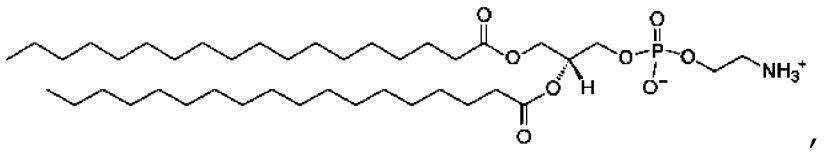
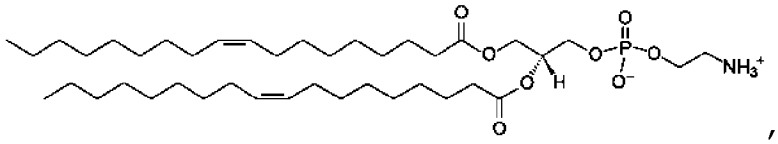
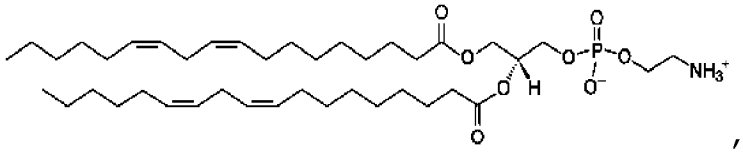
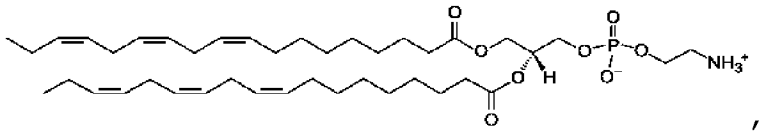
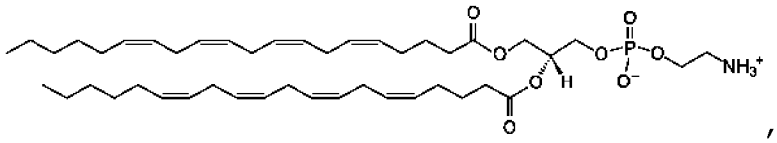
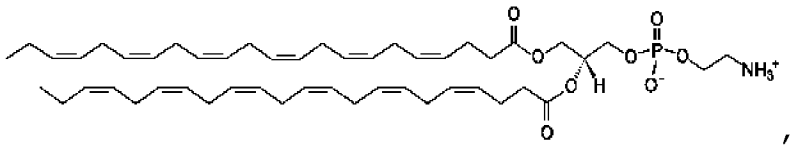
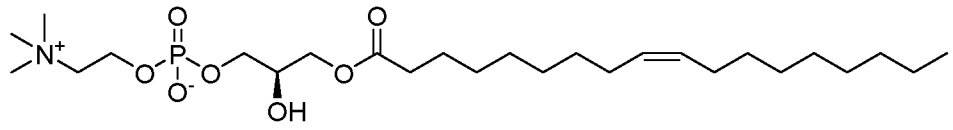
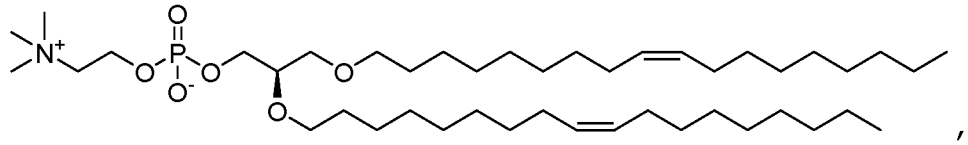
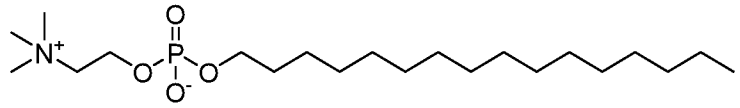
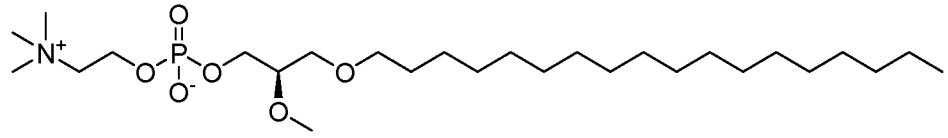
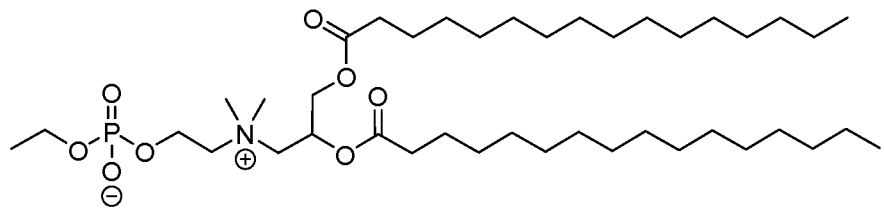

,


,


,

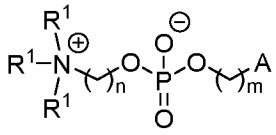

,


,


,

,

,

,

,

,

,

,

,

, и

.

В определенных вариантах осуществления фосфолипид, полезный или потенциально полезный в данном изобретении, представляет

собой аналог или вариант DSPC (1,2-диоктадеканоил-sn-глицеро-3-фосфохолин). В определенных вариантах осуществления фосфолипид, полезный или потенциально полезный в данном изобретении, представляет собой соединение формулы (IX):



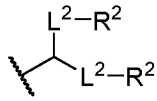
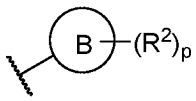
(**IX**),

(или его солью, где:

каждый $R^1$ независимо представляет собой необязательно замещенный алкил; или необязательно два $R^1$ соединены вместе с промежуточными атомами с образованием необязательно замещенного моноциклического карбоциклила или необязательно замещенного моноциклического гетероциклила; или необязательно три $R^1$ соединены вместе с промежуточными атомами с образованием необязательно замещенного бициклического карбоциклила или необязательно замещенного бициклического гетероциклила;

n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

m равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

А имеет формулу:  или  ;

каждый пример $L^2$ независимо представляет собой связь или необязательно замещенный $C_{1-6}$ алкилен, где одно метиленовое звено необязательно замещенного $C_{1-6}$ алкилена необязательно заменено O, $N(R^N)$, S, C(O), $C(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)$, C(O)O, OC(O), OC(O)O, $OC(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)O$, или $NR^NC(O)N(R^N)$;

каждый пример $R^2$ независимо представляет собой необязательно замещенный $C_{1-30}$ алкил, необязательно замещенный $C_{1-30}$ алкенил или необязательно замещенный $C_{1-30}$ алкинил; необязательно, где одно или более метиленовых звеньев $R^2$ независимо замещены необязательно замещенным карбоциклиленом, необязательно замещенным гетероциклиленом, необязательно замещенным ариленом, необязательно замещенным гетероариленом, $N(R^N)$, O, S, C(O), $C(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)$, $NR^NC(O)N(R^N)$, C(O)O, OC(O), OC(O)O, $OC(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)O$, C(O)S, SC(O), $C(=NR^N)$, $C(=NR^N)N(R^N)$, $NR^NC(=NR^N)$, $NR^NC(=NR^N)N(R^N)$, C(S), $C(S)N(R^N)$, $NR^NC(S)$, $NR^NC(S)N(R^N)$, S(O), OS(O), S(O)O, OS(O)O, $OS(O)_2$, $S(O)_2O$, $OS(O)_2O$, $N(R^N)S(O)$, $S(O)N(R^N)$, $N(R^N)S(O)N(R^N)$, $OS(O)N(R^N)$, $N(R^N)S(O)O$, $S(O)_2$, $N(R^N)S(O)_2$, $S(O)_2N(R^N)$, $N(R^N)S(O)_2N(R^N)$, $OS(O)_2N(R^N)$, или

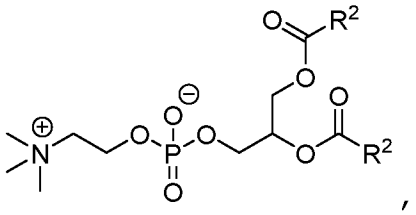
$N(R^N)S(O)_2O$;

каждый пример $R^N$ независимо представляет собой водород, необязательно замещенный алкил или защитную группу азота;

Кольцо B представляет собой необязательно замещенный карбоциклил, необязательно замещенный гетероциклил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил; и

p представляет собой 1 или 2;

при условии, что соединение не имеет формулу:

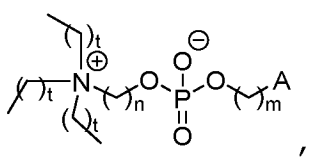


,

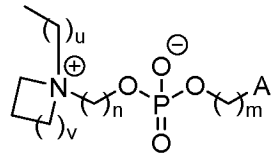
где каждый пример $R^2$ независимо представляет собой незамещенный алкил, незамещенный алкенил или незамещенный алкинил.

i) Модификации фосфолипидной головки

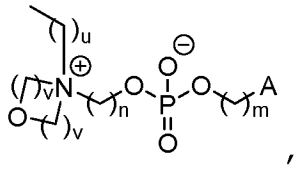
В некоторых вариантах осуществления фосфолипид, полезный или потенциально полезный в данном изобретении, содержит модифицированную фосфолипидную головку (например, модифицированную холиновую группу). В некоторых вариантах осуществления фосфолипид с модифицированной головкой представляет собой DSPC или его аналог с модифицированным четвертичным амином. Например, в вариантах осуществления формулы (**IX**) по меньшей мере один из $R^1$ не является метилом. В некоторых вариантах по меньшей мере один из $R^1$ не является водородом или метилом. В определенных вариантах осуществления соединение формулы (**IX**) имеет одну из следующих формул:



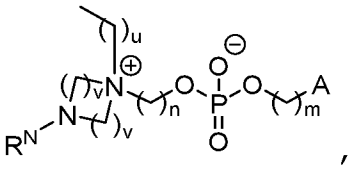
,



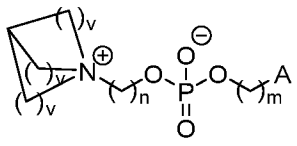
,



,



,



,

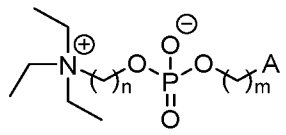
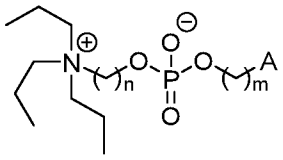
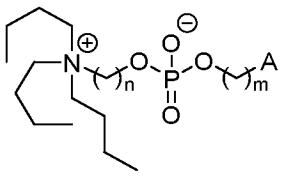
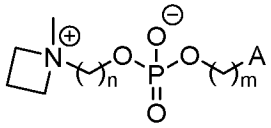
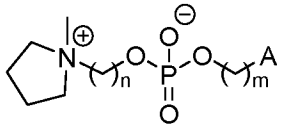
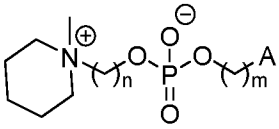
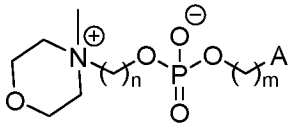
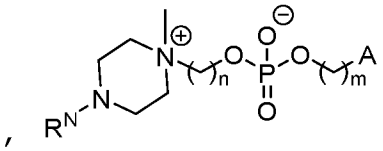
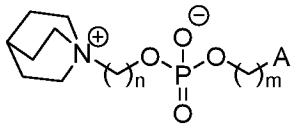
или его соль, где:

каждый t независимо представляет собой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

каждый u независимо представляет собой 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10; и

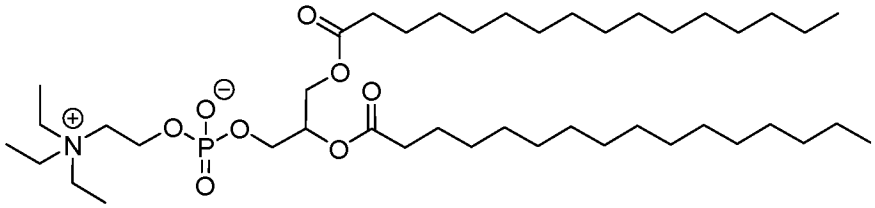
каждый v независимо представляет собой 1, 2 или 3.

В определенных вариантах осуществления соединение формулы (**IX**) имеет одну из следующих формул:

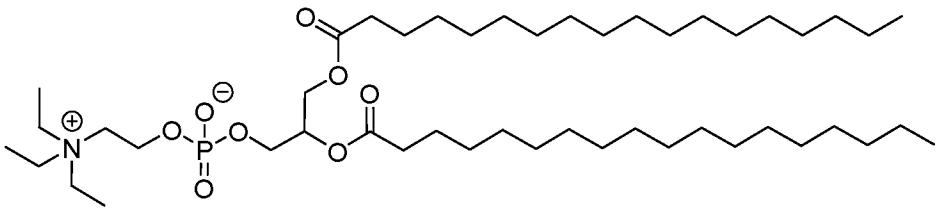

,

,

,

,

,

,

,

,

,

или его соль.

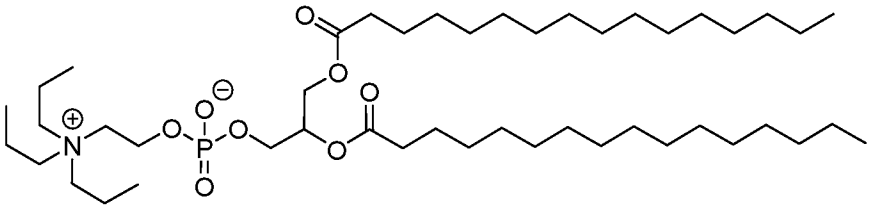
В определенных вариантах осуществления соединение формулы (IX) является одним из следующих:



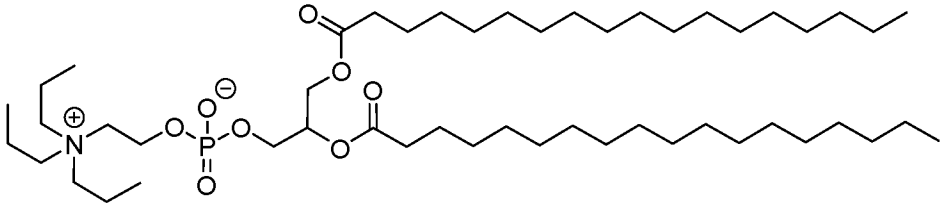
(Соединение 400)



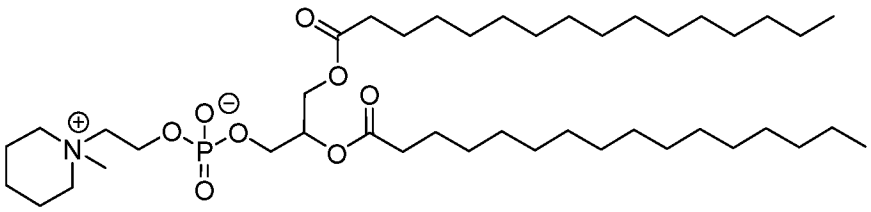
(Соединение 401)



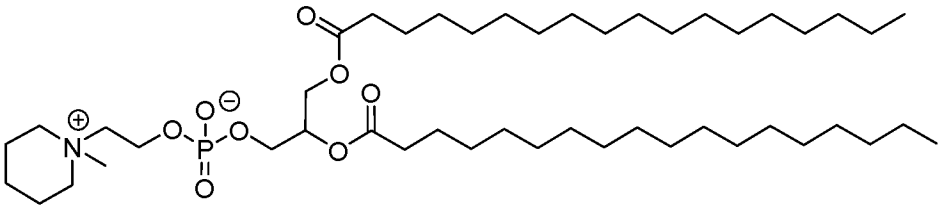
(Соединение 402)



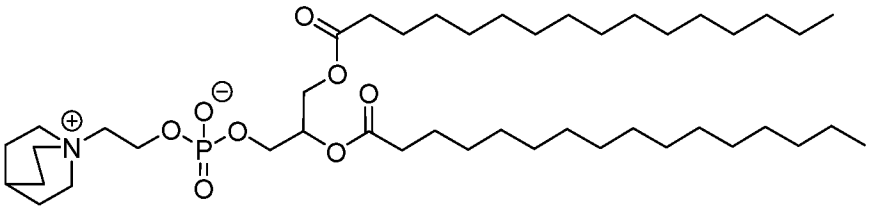
(Соединение 403)



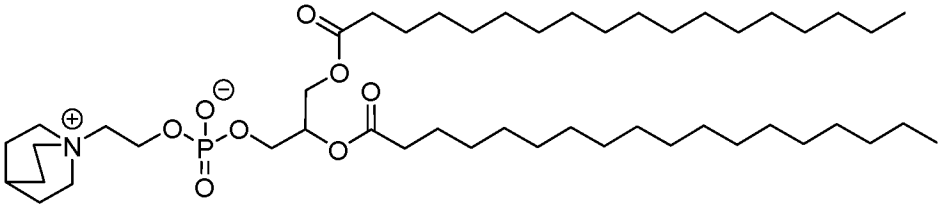
(Соединение 404)



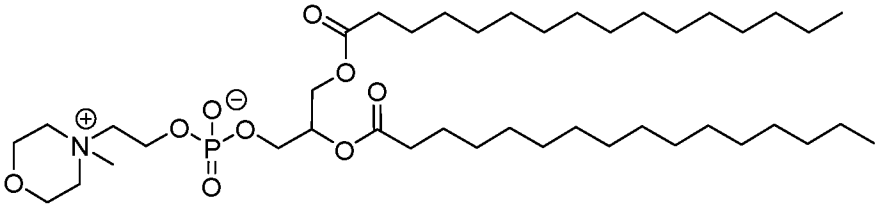
(Соединение 405)



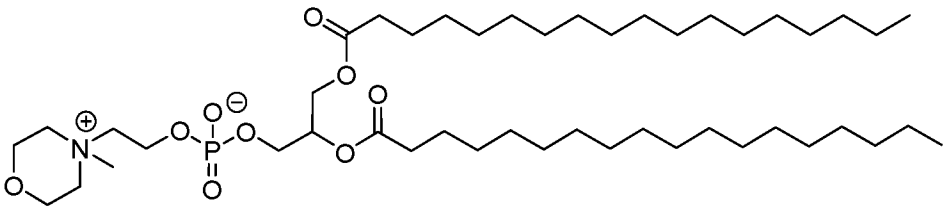
(Соединение 406)



(Соединение 407)



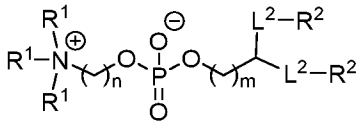
(Соединение 408)



(Соединение 409),

или его соль.

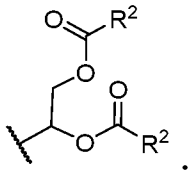
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (**IX**) имеет формулу (**IX-a**):



(**IX-a**),

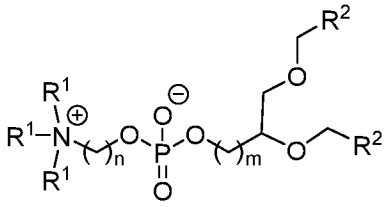
или его соль.

В определенных вариантах осуществления фосфолипиды, полезные или потенциально полезные в данном изобретении, содержат модифицированную головку. В определенных вариантах осуществления фосфолипид с модифицированной головкой, описанной в данном документе, представляет собой DSPC или его аналог с модифицированной структурой головки. Например, в некоторых вариантах осуществления формулы (**IX-a**) группа A не относится к следующей формуле:

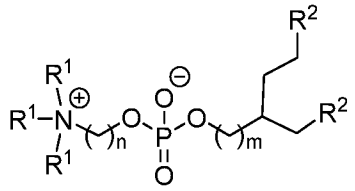


.

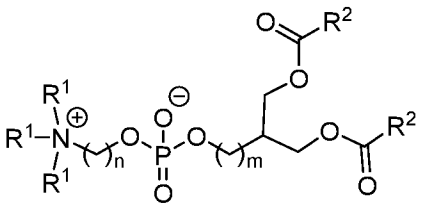
В определенных вариантах осуществления соединение формулы (**IX-a**) имеет одну из следующих формул:



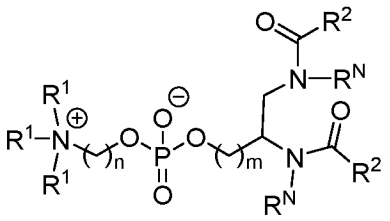
,



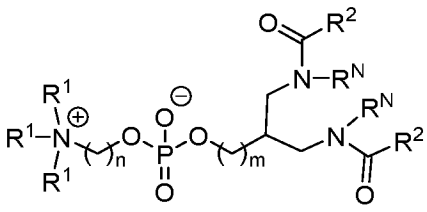
,



,



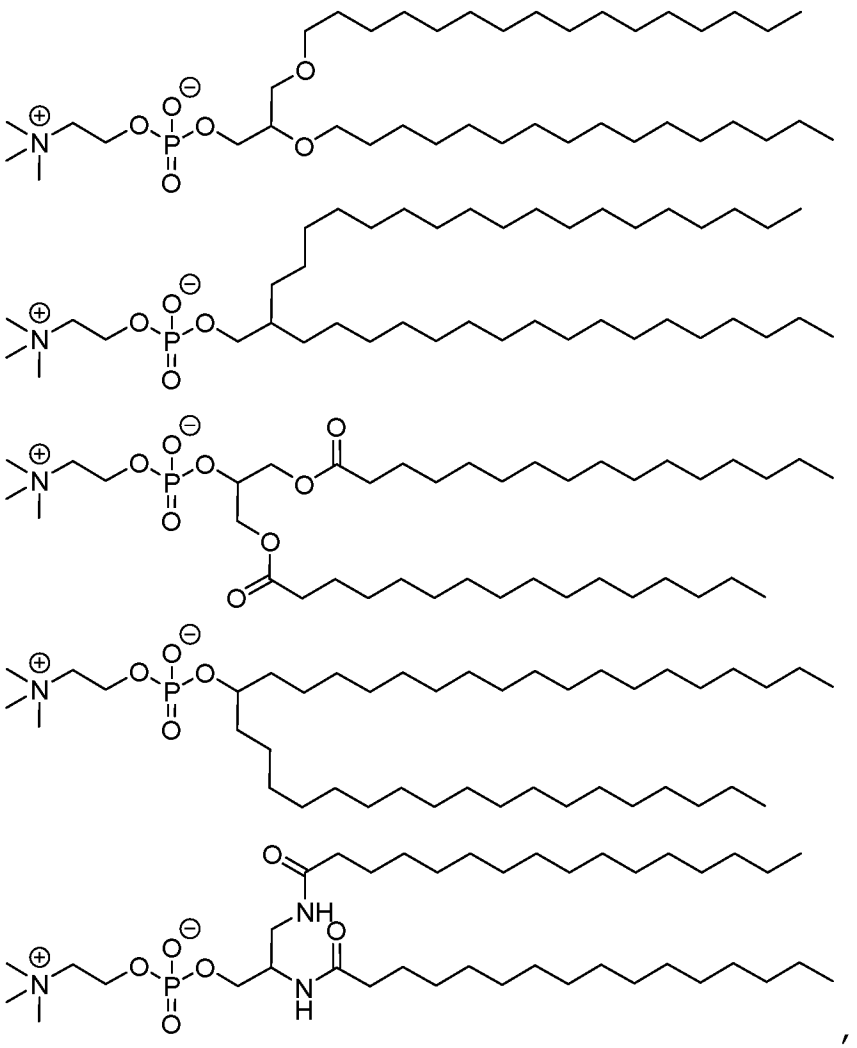
,



,

или его соль.

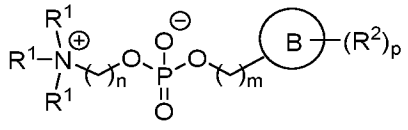
В определенных вариантах осуществления соединение формулы (IX) является одним из следующих:



,

или его соли.

В определенных вариантах осуществления фосфолипид, полезный или потенциально полезный в данном изобретении, содержит циклический фрагмент вместо глицеридного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления фосфолипид, полезный в данном изобретении, представляет собой DSPC (1,2-диоктадеканоил-sn-глицеро-3-фосфохолин) или его аналог, с циклическим фрагментом вместо глицеридного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (**IX**) имеет формулу (**IX-b**):

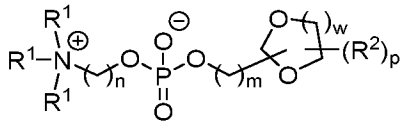


,

(**IX-b**),

или его соль.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (**IX-b**) имеет формулу (**IX-b-1**):

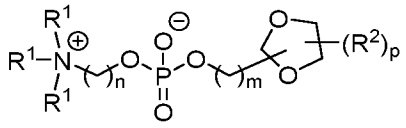


(**IX-b-1**),

или его соль, где:

w равно 0, 1, 2 или 3.

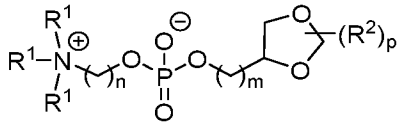
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (**IX-b**) имеет формулу (**IX-b-2**):



(**IX-b-2**),

или его соль.

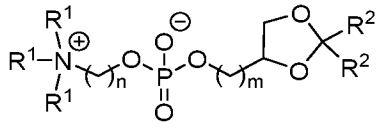
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (**IX-b**) имеет формулу (**IX-b-3**):



(**IX-b-3**),

или его соль.

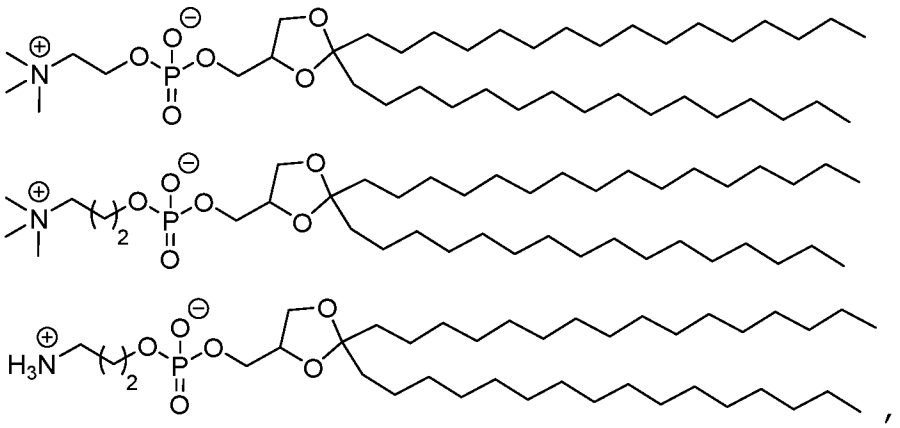
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (**IX-b**) имеет формулу (**IX-b-4**):



(**IX-b-4**),

или его соль.

В определенных вариантах осуществления соединение формулы (**IX-b**) имеет одну из следующих формул:



,

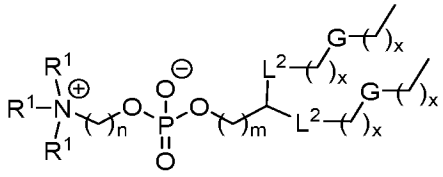
или его соли.

(ii) Модификации фосфолипидного хвоста

В определенных вариантах осуществления фосфолипид, полезный или потенциально полезный в данном изобретении, содержит

модифицированный хвост. В некоторых вариантах осуществления фосфолипид, полезный или потенциально полезный в данном изобретении, представляет собой DSPC (1,2-диоктадеканоил-sn-глицеро-3-фосфохолин) или его аналог с модифицированным хвостом. Как описано в данном документе, «модифицированный хвост» может быть хвостом с более короткими или более длинными алифатическими цепями, алифатическими цепями с введенным разветвлением, алифатическими цепями с введенными заместителями, алифатическими цепями, в которых один или более метиленов замещены циклическими или гетероатомными группами, или с любой их комбинацией. Например, в некоторых вариантах осуществления соединение (**IX**) имеет формулу (**IX-a**) или его соль, где по меньшей мере один пример $R^2$ представляет собой каждый пример $R^2$, необязательно замещенный $C_{1-30}$ алкилом, причем один или больше метиленовых звеньев $R^2$ независимо замещены необязательно замещенным карбоциклиленом, необязательно замещенным гетероциклиленом, необязательно замещенным ариленом, необязательно замещенным гетероариленом, $N(R^N)$, O, S, C(O), $C(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)$, $NR^NC(O)N(R^N)$, C(O)O, OC(O), OC(O)O, $OC(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)O$, C(O)S, SC(O), $C(=NR^N)$, $C(=NR^N)N(R^N)$, $NR^NC(=NR^N)$, $NR^NC(=NR^N)N(R^N)$, C(S), $C(S)N(R^N)$, $NR^NC(S)$, $NR^NC(S)N(R^N)$, S(O), OS(O), S(O)O, OS(O)O, $OS(O)_2$, $S(O)_2O$, $OS(O)_2O$, $N(R^N)S(O)$, $S(O)N(R^N)$, $N(R^N)S(O)N(R^N)$, $OS(O)N(R^N)$, $N(R^N)S(O)O$, $S(O)_2$, $N(R^N)S(O)_2$, $S(O)_2N(R^N)$, $N(R^N)S(O)_2N(R^N)$, $OS(O)_2N(R^N)$, или $N(R^N)S(O)_2O$.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (**IX**) имеет формулу (**IX-c**):



(**IX-c**),

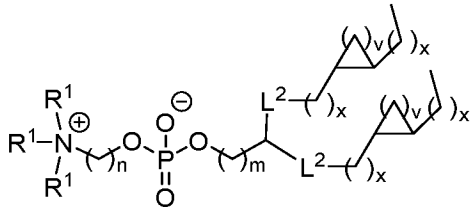
или его соль, где:

каждый x независимо представляет собой целое число от 0 до 30 включительно; и

каждый пример G независимо выбирают из группы, состоящей из необязательно замещенного карбоциклилена, необязательно замещенного гетероциклилена, необязательно замещенного арилена, необязательно замещенного гетероарилена, $N(R^N)$, O, S, C(O), $C(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)$, $NR^NC(O)N(R^N)$, C(O)O, OC(O), OC(O)O, $OC(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)O$, C(O)S, SC(O), $C(=NR^N)$, $C(=NR^N)N(R^N)$, $NR^NC(=NR^N)$, $NR^NC(=NR^N)N(R^N)$, C(S), $C(S)N(R^N)$, $NR^NC(S)$,

$NR^NC(S)N(R^N)$, $S(O)$, $OS(O)$, $S(O)O$, $OS(O)O$, $OS(O)_2$, $S(O)_2O$, $OS(O)_2O$, $N(R^N)S(O)$, $S(O)N(R^N)$, $N(R^N)S(O)N(R^N)$, $OS(O)N(R^N)$, $N(R^N)S(O)O$, $S(O)_2$, $N(R^N)S(O)_2$, $S(O)_2N(R^N)$, $N(R^N)S(O)_2N(R^N)$, $OS(O)_2N(R^N)$, или $N(R^N)S(O)_2O$. Каждый вариант представляет отдельный вариант осуществления данного изобретения.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (**IX-c**) имеет формулу (**IX-c-1**):

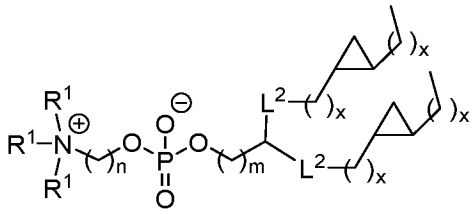


(**IX-c-1**),

или его соль, где:

каждый случай v независимо представляет собой 1, 2 или 3.

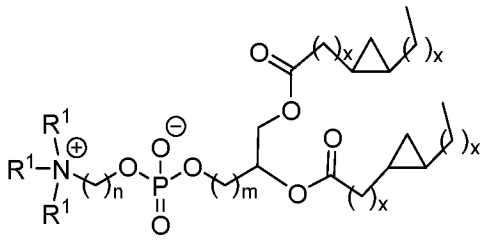
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (**IX-c**) имеет формулу (**IX-c-2**):



(**IX-c-2**),

или его соль.

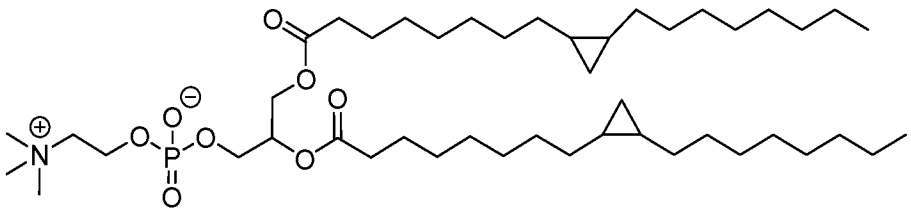
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (IX-c) имеет следующую формулу:



,

или его соль.

В определенных вариантах осуществления соединение формулы (**IX-c**) является следующим:

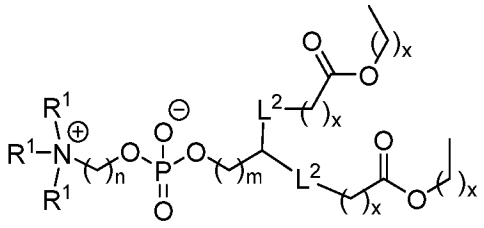


,

или его соль.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (**IX-**

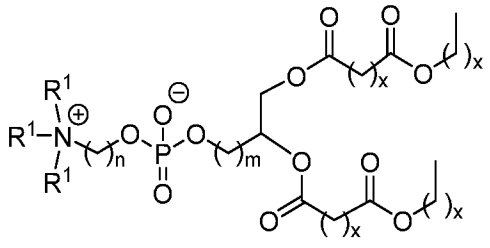
**c**) имеет формулу (**IX-c-3**):



(**IX-c-3**),

или его соль.

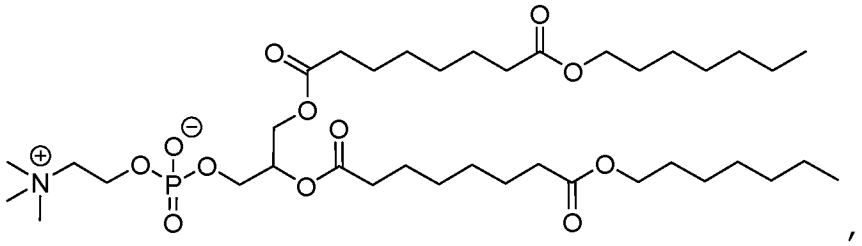
В определенных вариантах осуществления соединение формулы (**IX-c**) имеет следующие формулы:



,

или его соль.

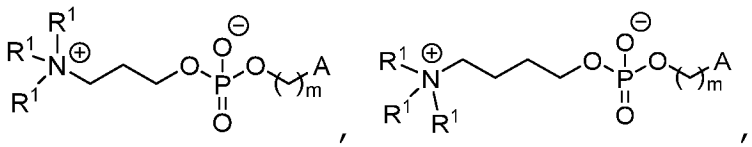
В определенных вариантах осуществления соединение формулы (**IX-c**) является следующим:



,

или его соль.

В некоторых вариантах осуществления фосфолипид, полезный или потенциально полезный в данном изобретении, содержит модифицированный фосфохолиновый фрагмент, где алкильная цепь, связывающая четвертичный амин с фосфорильной группой, не является этиленом (например, n не равен 2). Следовательно, в определенных вариантах осуществления фосфолипид, полезный или потенциально полезный в данном изобретении, представляет собой соединение формулы (**IX**), где n равно 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. Например, в определенных вариантах осуществления соединение формулы (**IX**) имеет одну из следующих формул:



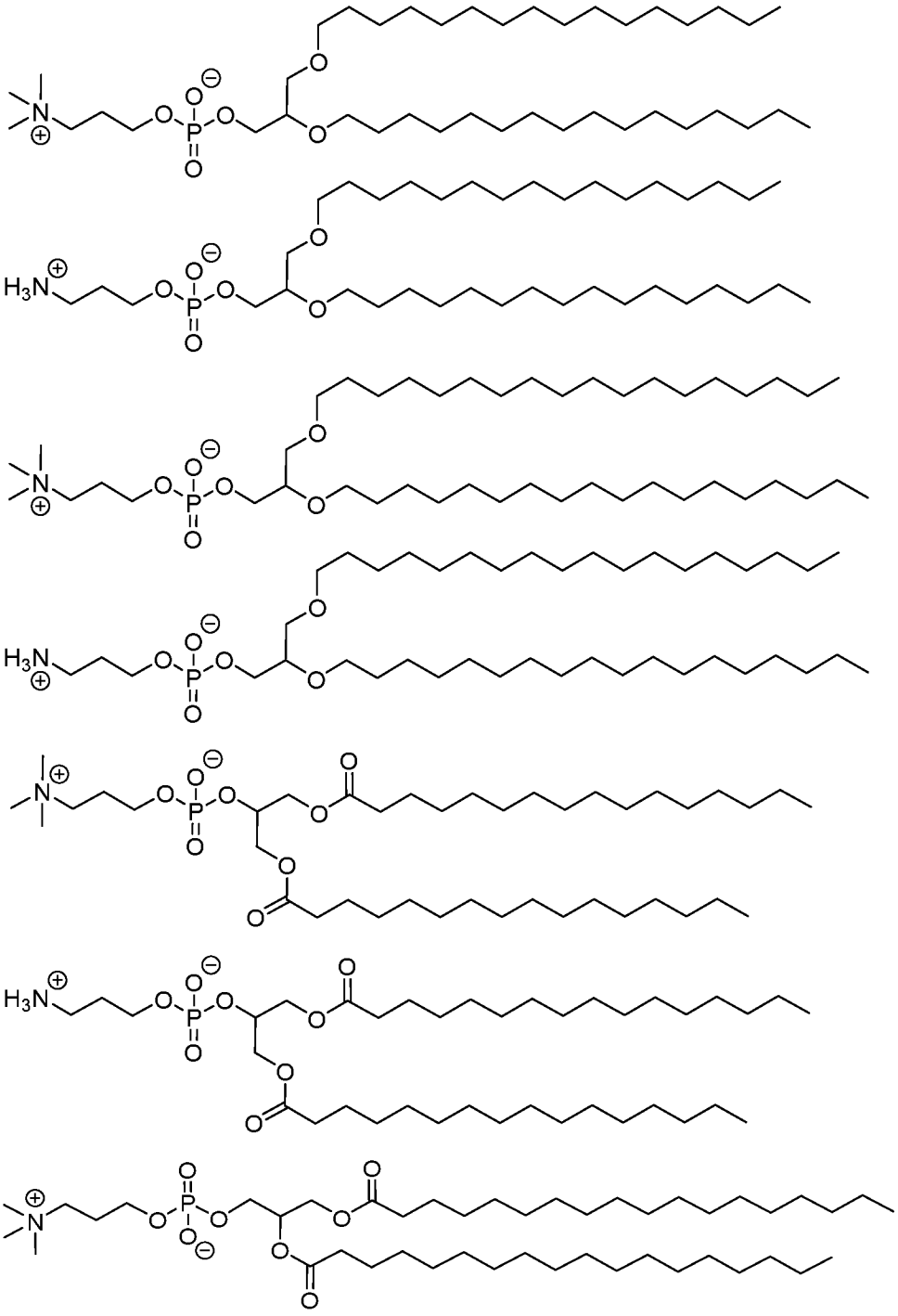
,

,

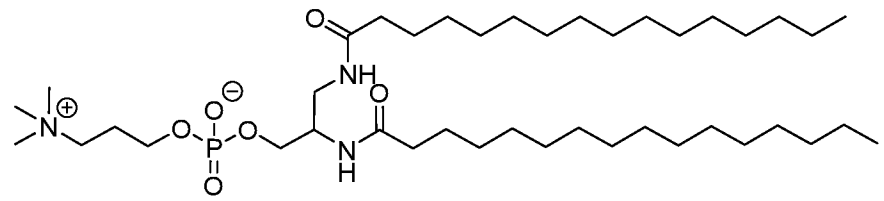
или его соль.

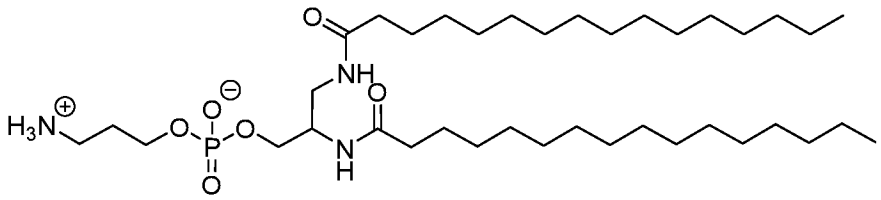
В определенных вариантах осуществления соединение формулы

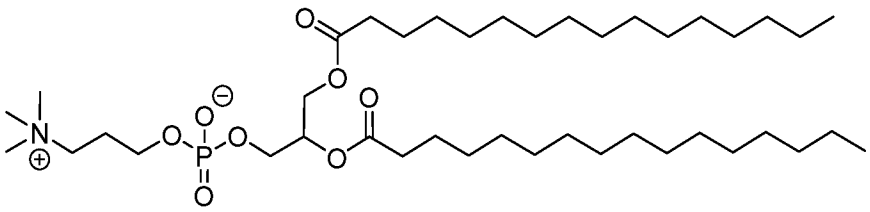
(IX) является одним из следующих:



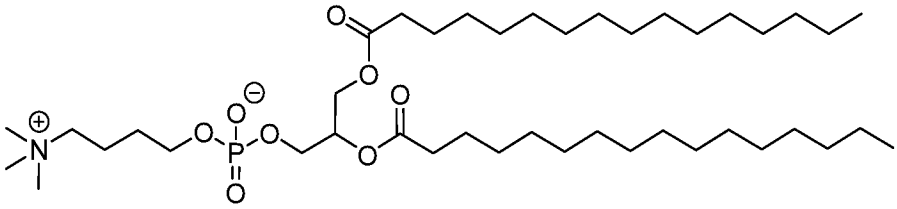
(Соединение 411)



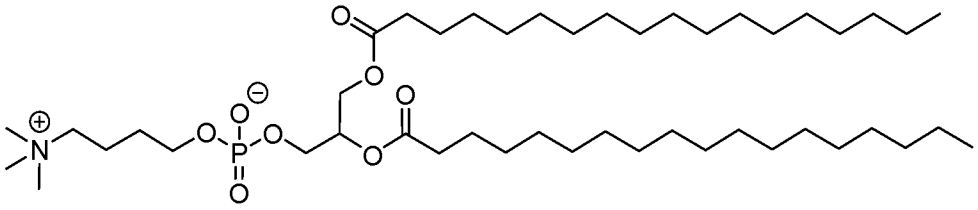




(Соединение 412)



(Соединение 413)

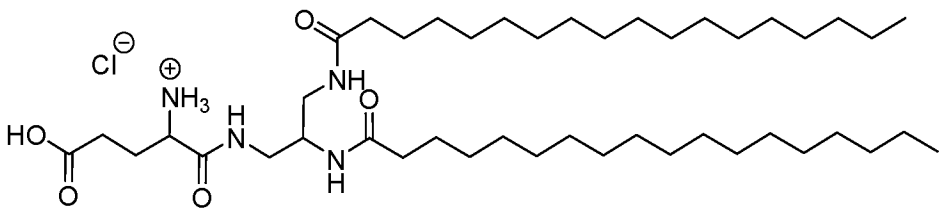


(Соединение 414),

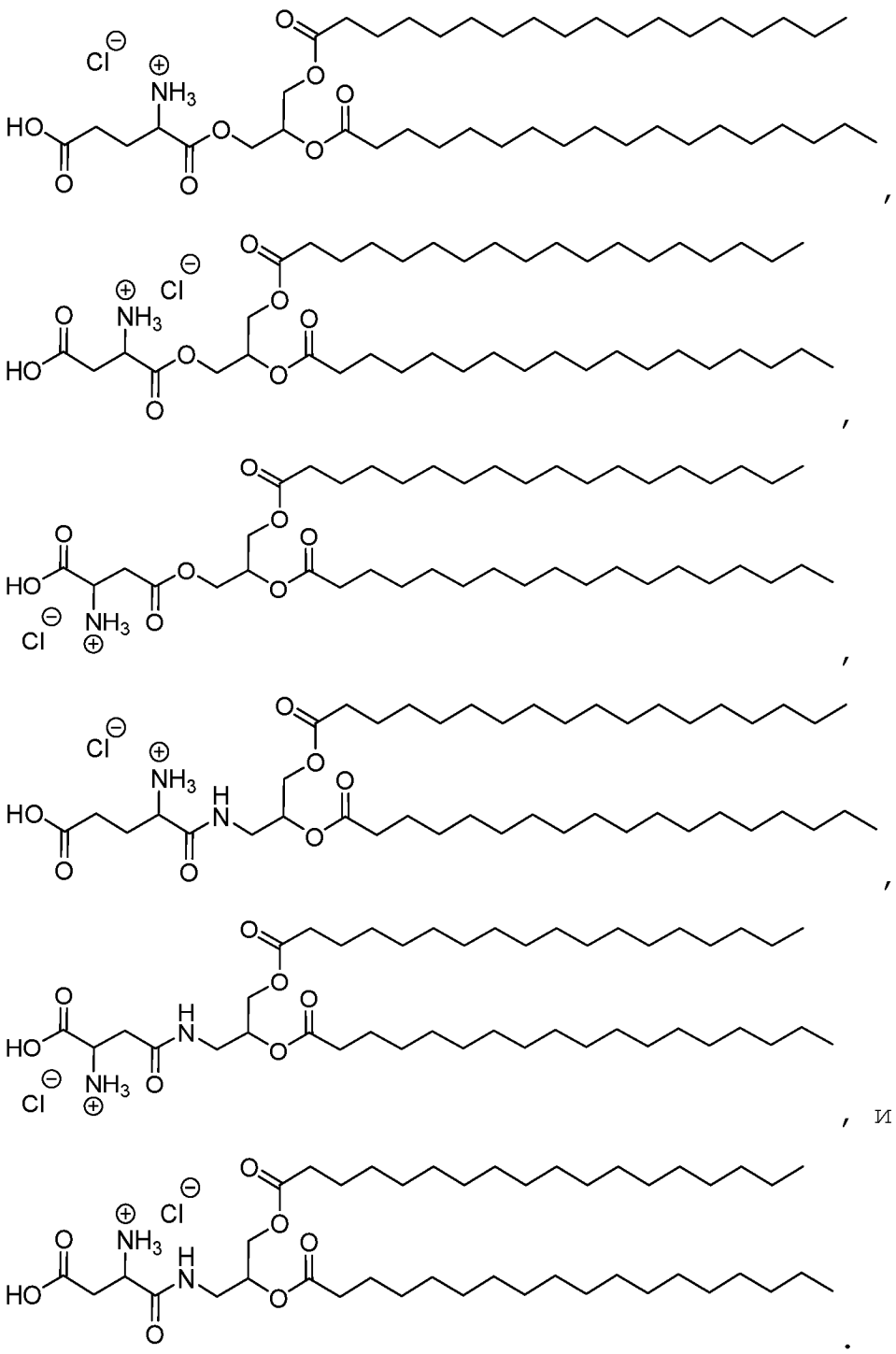
или его соли.

**c. Альтернативные липиды**

В определенных вариантах осуществления вместо фосфолипида согласно изобретению используется альтернативный липид. Неограничивающие примеры таких альтернативных липидов включают следующее:



,



, и

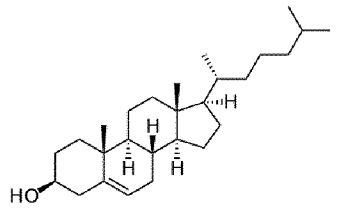
.

**d. Структурные липиды**

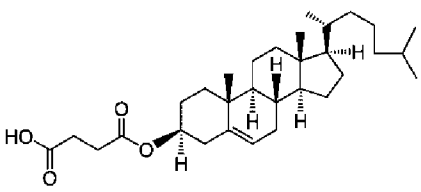
Липидная композиция фармацевтической композиции, раскрытая в данном документе, может содержать один или более структурных липидов. Используемый в данном документе термин «структурный липид» относится к стеринам, а также к липидам, содержащим фрагменты стеринов.

Включение структурных липидов в липидную наночастицу может помочь уменьшить агрегацию других липидов в частице. Структурные липиды могут быть выбраны из группы, включающей, но не

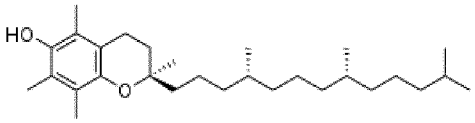
ограничиваются этим, холестерин, фекостерин, ситостерин, эргостерин, кампестерин, стигмастерин, брассикастерин, томатидин, томатин, урсоловую кислоту, альфа-токоферол, гопаноиды, фитостерины, стероиды и их смеси. В некоторых вариантах осуществления структурный липид представляет собой стерин. Как здесь определено, «стерины» представляют собой подгруппу стероидов, состоящую из стероидных спиртов. В определенных вариантах осуществления структурный липид представляет собой стероид. В определенных вариантах осуществления структурный липид представляет собой холестерин. В определенных вариантах осуществления структурный липид представляет собой аналог холестерина. В определенных вариантах осуществления структурный липид представляет собой альфа-токоферол. Примеры структурных липидов включают, но не ограничиваются ими, следующее:




,




, и




.

В одном варианте осуществления количество структурного липида (например, стерина, такого как холестерин) в липидной композиции фармацевтической композиции, раскрытой в данном документе, находится в диапазоне от около 20 мол.% до около 60 мол.%, от около 25 мол.% до около 55 мол.%, от около 30 мол.% до около 50 мол.% или от около 35 мол.% до около 45 мол.%.

В одном варианте осуществления количество структурного липида (например, стерина, такого как холестерин) в липидной композиции, раскрытой в данном документе, находится в диапазоне от около 25 мол.% до около 30 мол.%, от около 30 мол.% до около 35 мол.% или от около 35 мол.% до около 40 мол.%.

В одном варианте осуществления количество структурного

липида (например, стерина, такого как холестерин) в липидной композиции, раскрытой в данном документе, составляет около 24 мол.%, около 29 мол.%, около 34 мол.% или около 39 мол.%.

В некоторых вариантах осуществления количество структурного липида (например, стерина, такого как холестерин) в липидной композиции, раскрытой в данном документе, составляет по меньшей мере около 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 или 60 мол.%.

**e. Полиэтиленгликоль (ПЭГ)–липиды**

Липидная композиция фармацевтической композиции, раскрытой в данном документе, может содержать один или более полиэтиленгликоль (ПЭГ)-липидов.

Используемый в данном документе термин «ПЭГ–липид» относится к липидам, модифицированным полиэтиленгликолем (ПЭГ). Неограничивающие примеры ПЭГ–липидов включают ПЭГ-модифицированные фосфатидилэтаноламин и фосфатидную кислоту, конъюгаты ПЭГ–церамиды (например, ПЭГ-CerC14 или ПЭГ-CerC20), ПЭГ–модифицированные диалкиламины и ПЭГ–модифицированные 1,2-диацилоксипропан-3-амины. Такие липиды также называют пегилированными липидами. Например, ПЭГ–липид может представлять собой липид ПЭГ-c-DOMG, ПЭГ-DMG, ПЭГ-DLPE, ПЭГDMPE, ПЭГ-DPPC, или ПЭГ-DSPE.

В некоторых вариантах осуществления ПЭГ–липид включает, но не ограничивается ими, 1,2-димиристоил-sn-глицерин метоксиполиэтиленгликоль (ПЭГ-DMG), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N- [амино(полиэтиленгликоль)] (ПЭГ-DSPE), ПЭГ-дистерилглицерин (ПЭГ-DSG), ПЭГ-дипалметолеил, ПЭГ-диолеил, ПЭГ-дистеарил, ПЭГ-диацилгликамид (ПЭГ-DAG), ПЭГ-дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (ПЭГ-DPPE) или ПЭГ-1,2-димиристилоксилпропил-3-амин (ПЭГ-c-DMA).

В одном варианте осуществления ПЭГ–липид выбирают из группы, состоящей из ПЭГ–модифицированного фосфатидилэтаноламина, ПЭГ–модифицированной фосфатидной кислоты, ПЭГ–модифицированного церамида, ПЭГ–модифицированного диалкиламина, ПЭГ–модифицированного диацилглицерина, ПЭГ-модифицированного диалкилглицерина и их смеси.

В некоторых вариантах осуществления липидный фрагмент ПЭГ-липидов включает такие, которые имеют длину от около $C_{14}$ до около $C_{22}$, предпочтительно от около $C_{14}$ до около $C_{16}$. В некоторых

вариантах осуществления фрагмент ПЭГ, например mPEG-$NH_2$, имеет размер около 1000, 2000, 5000, 10000, 15000 или 20000 дальтон. В одном варианте осуществления ПЭГ-липид представляет собой $PEG_{2k}$-DMG.

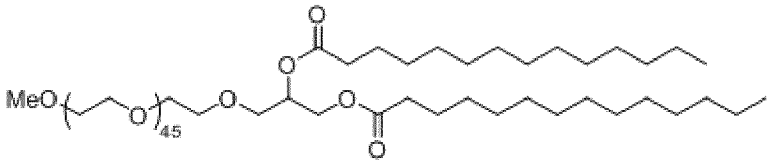
В одном варианте осуществления описанные в данном документе липидные наночастицы могут содержать ПЭГ-липид, который представляет собой недиффундирующий ПЭГ. Неограничивающие примеры недиффундирующих ПЭГ включают ПЭГ-DSG и ПЭГ-DSPE.

ПЭГ-липиды известны в данной области техники, такие как те, которые описаны в патенте США № 8158601 и публикации международной заявки № WO 2015/130584 A2, которые включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

В целом, некоторые из других липидных компонентов (например, ПЭГ-липидов) различных формул, описанных в данном документе, могут быть синтезированы, как описано в международной заявке на патент № PCT/US2016/000129, поданной 10 декабря 2016 года, под названием “Compositions and Methods for Delivery of Therapeutic Agents,” которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

Липидный компонент композиции липидных наночастиц может включать одну или более молекул, содержащие полиэтиленгликоль, такие как ПЭГ или ПЭГ-модифицированные липиды. Такие виды могут альтернативно называться пегилированными липидами. ПЭГ-липид представляет собой липид, модифицированный полиэтиленгликолем. ПЭГ-липид может быть выбран из неограничивающей группы, включая ПЭГ-модифицированные фосфатидилэтаноламины, ПЭГ-модифицированные фосфатидные кислоты, ПЭГ-модифицированные церамиды, ПЭГ-модифицированные диалкиламины, ПЭГ-модифицированные диацилглицерины, ПЭГ-модифицированные диалкилглицерины и их смеси. Например, ПЭГ-липид может представлять собой липид ПЭГ-c-DOMG, ПЭГ-DMG, ПЭГ-DLPE, ПЭГDMPE, ПЭГ-DPPC, или ПЭГ-DSPE.

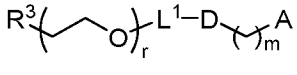
В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-модифицированные липиды представляют собой модифицированные формы ПЭГ DMG. ПЭГ-DMG имеет следующую структуру:




В одном варианте осуществления ПЭГ-липиды, используемые в данном изобретении, могут представлять собой пегилированные

липиды, описанные в международной публикации № WO2012099755, содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки. Любой из этих иллюстративных ПЭГ-липидов, описанных в данном документе, может быть модифицирован для включения гидроксильной группы в цепь ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой ПЭГ-ОН липид. Как обычно определено в данном документе, «ПЭГ-ОН липид» (также называемый в данном документе «гидрокси-пегилированный липид») представляет собой пегилированный липид, имеющий одну или более гидроксильных (-ОН) групп в липиде. В определенных вариантах осуществления ПЭГ-ОН липид содержит одну или более гидроксильных групп в цепи ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-ОН или гидрокси-пегилированный липид содержит группу -ОН в конце цепи ПЭГ. Каждый вариант представляет отдельный вариант осуществления данного изобретения.

В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид, используемый в данном изобретении, представляет собой соединение формулы (VII). В данном документе представлены соединения формулы (**VII**):


(**VII**),

или их соли, где:

$R^3$ представляет собой $-OR^O$;

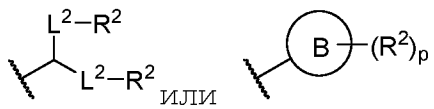
$R^O$ представляет собой водород, необязательно замещенный алкил или защитную группу кислорода;

r представляет собой целое число от 1 до 100, включительно;

$L^1$ представляет собой необязательно замещенный $C_{1-10}$ алкилен, при этом по меньшей мере один метилен из необязательно замещенного $C_{1-10}$ алкилена независимо заменен необязательно замещенным карбоциклиленом, необязательно замещенным гетероциклиленом, необязательно замещенным ариленом, необязательно замещенным гетероариленом, O, $N(R^N)$, S, C(O), $C(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)$, C(O)O, OC(O), OC(O)O, $OC(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)O$ или $NR^NC(O)N(R^N)$;

D представляет собой фрагмент, полученный при помощи методов клик-химии, или фрагмент, расщепляемый в физиологических условиях;

m равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

A имеет формулу:  или ;

каждый пример $L^2$ независимо представляет собой связь или необязательно замещенный $C_{1-6}$ алкилен, где одно метиленовое звено необязательно замещенного $C_{1-6}$ алкилена необязательно заменено O, $N(R^N)$, S, C(O), $C(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)$, C(O)O, OC(O), OC(O)O, $OC(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)O$, или $NR^NC(O)N(R^N)$;

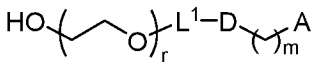
каждый пример $R^2$ независимо представляет собой необязательно замещенный $C_{1-30}$ алкил, необязательно замещенный $C_{1-30}$ алкенил или необязательно замещенный $C_{1-30}$ алкинил; необязательно, где одно или более метиленовых звеньев $R^2$ независимо замещены необязательно замещенным карбоциклиленом, необязательно замещенным гетероциклиленом, необязательно замещенным ариленом, необязательно замещенным гетероариленом, $N(R^N)$, O, S, C(O), $C(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)$, $NR^NC(O)N(R^N)$, C(O)O, OC(O), OC(O)O, $OC(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)O$, C(O)S, SC(O), $C(=NR^N)$, $C(=NR^N)N(R^N)$, $NR^NC(=NR^N)$, $NR^NC(=NR^N)N(R^N)$, C(S), $C(S)N(R^N)$, $NR^NC(S)$, $NR^NC(S)N(R^N)$, S(O), OS(O), S(O)O, OS(O)O, $OS(O)_2$, $S(O)_2O$, $OS(O)_2O$, $N(R^N)S(O)$, $S(O)N(R^N)$, $N(R^N)S(O)N(R^N)$, $OS(O)N(R^N)$, $N(R^N)S(O)O$, $S(O)_2$, $N(R^N)S(O)_2$, $S(O)_2N(R^N)$, $N(R^N)S(O)_2N(R^N)$, $OS(O)_2N(R^N)$, или $N(R^N)S(O)_2O$;

каждый пример $R^N$ независимо представляет собой водород, необязательно замещенный алкил или защитную группу азота;

Кольцо B представляет собой необязательно замещенный карбоциклил, необязательно замещенный гетероциклил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил; и

p представляет собой 1 или 2.

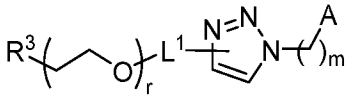
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (VII) представляет собой ПЭГ–OH липид (т.е. $R^3$ представляет собой $-OR^O$, и $R^O$ представляет собой водород). В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (**VII**) имеет формулу (**VII–OH**):



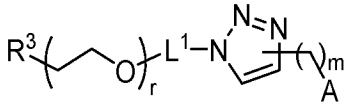
(VII–OH),

или его соль.

В некоторых вариантах осуществления D представляет собой группу, полученную при помощи методов клик-химии (например, триазол). В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (**VII**) имеет формулу (**VII–a–1**) или (**VII–a–2**):



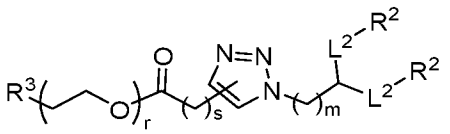
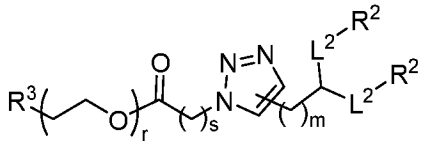
или

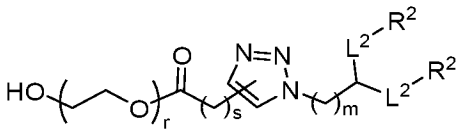
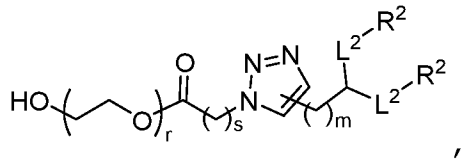


(**VII-a-1**) (**VII-a-2**),

или его соль.

В определенных вариантах осуществления соединение формулы (**VII**) имеет одну из следующих формул:

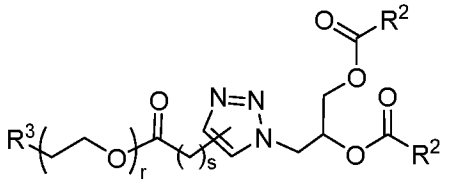
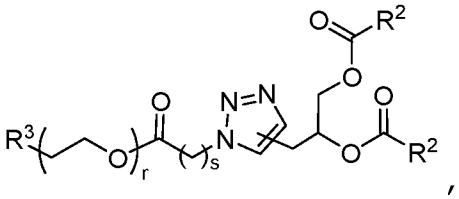

,

,

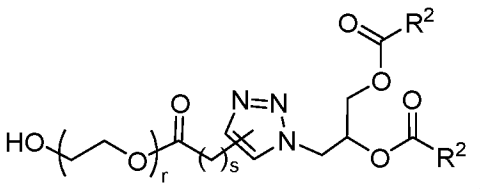
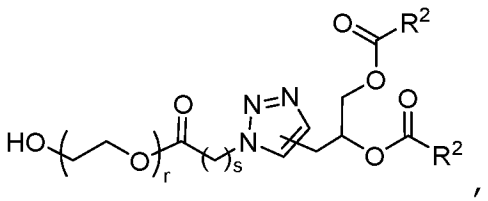

,

,

или его соль, где

s равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

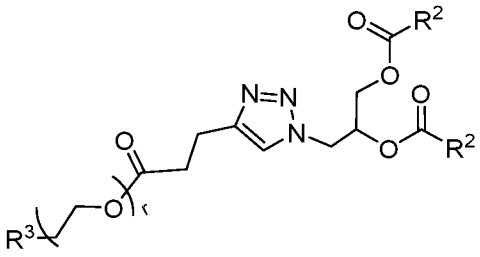
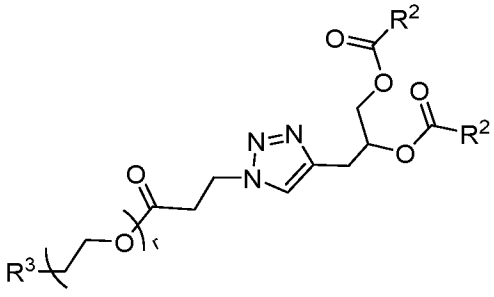
В определенных вариантах осуществления соединение формулы (**VII**) имеет одну из следующих формул:

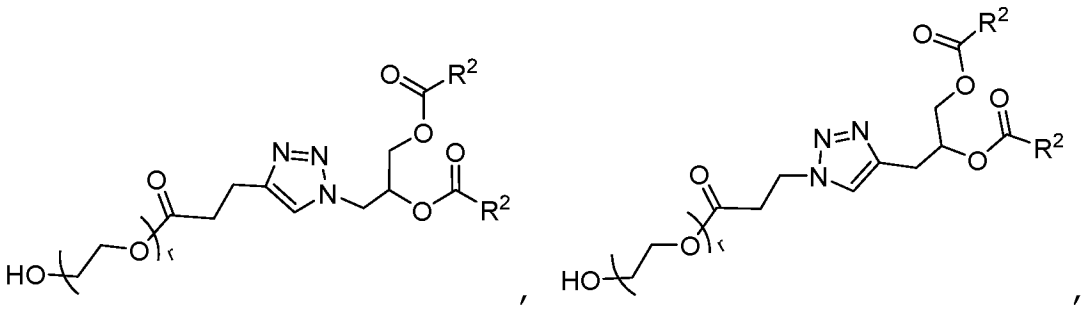

,

,


,

,

или его соль.

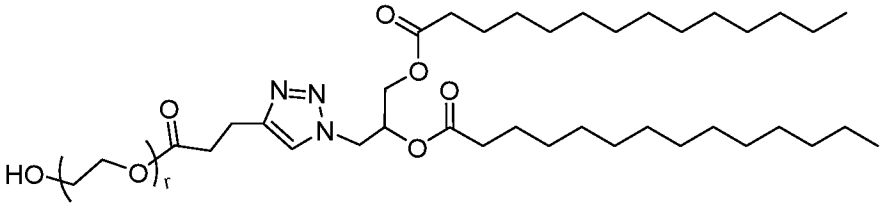
В определенных вариантах осуществления соединение формулы (**VII**) имеет одну из следующих формул:


,

,

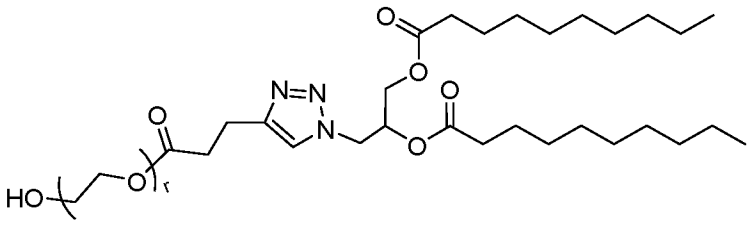


или его соль.

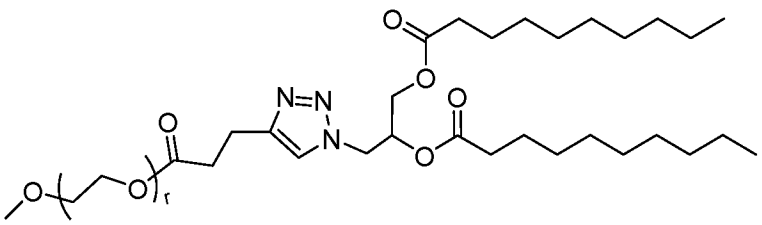
В определенных вариантах осуществления соединение формулы (**VII**) имеет одну из следующих формул:



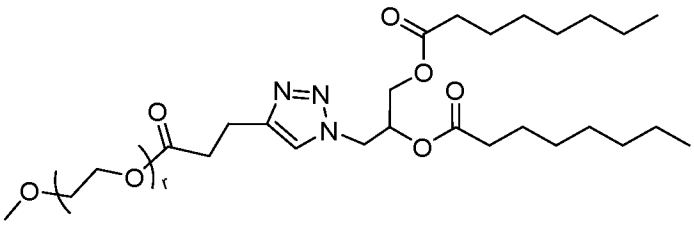
(Соединение 415),



(Соединение 416),



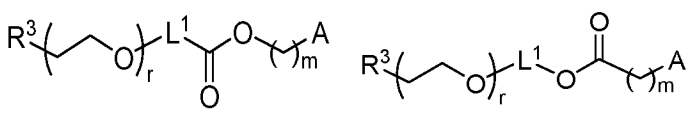
(Соединение 417),



(Соединение 418),

или его соль.

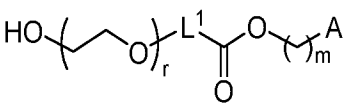
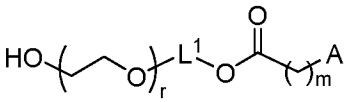
В некоторых вариантах осуществления D представляет собой фрагмент, расщепляемый в физиологических условиях (например, сложный эфир, амид, карбонат, карбамат, мочевину). В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (**VII**) имеет формулу (**VII-b-1**) или (**VII-b-2**):



(VII-b-1) (VII-b-2),

или его соль.

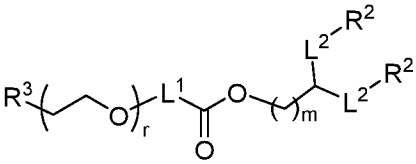
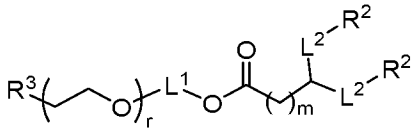
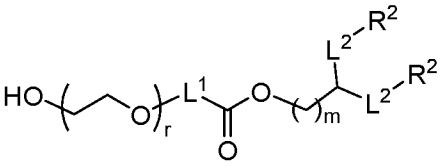
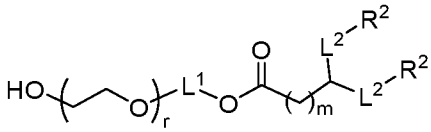
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (**VII**) имеет формулу (**VII-b-1-OH**) или (**VII-b-2-OH**):

(VII-b-1-OH) (VII-b-2-OH),

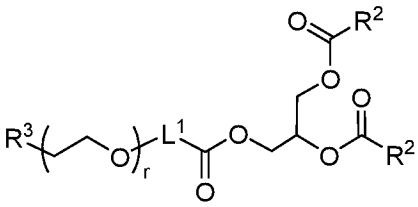
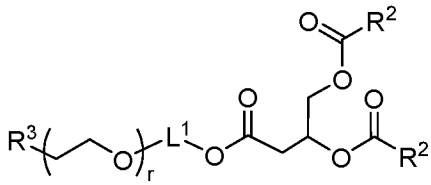
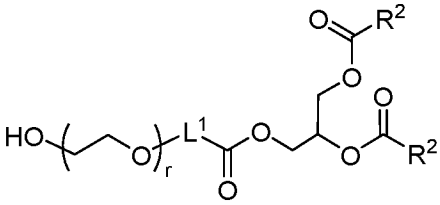
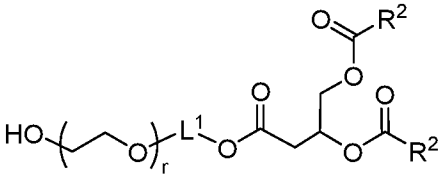
или его соль.

В определенных вариантах осуществления соединение формулы (**VII**) имеет одну из следующих формул:


,

,

,

,

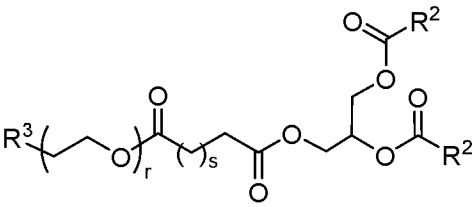
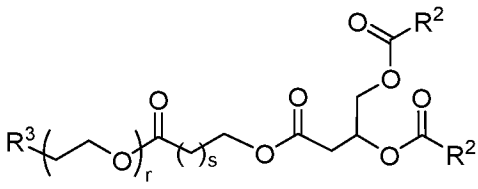
или его соль.

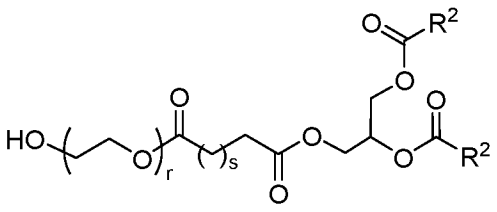
В определенных вариантах осуществления соединение формулы (**VII**) имеет одну из следующих формул:


,

,

,

,

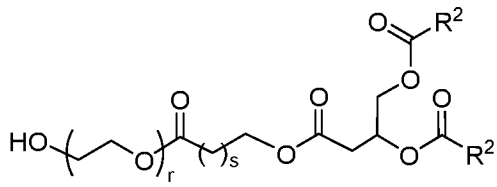
или его соль.

В определенных вариантах осуществления соединение формулы (**VII**) имеет одну из следующих формул:


,

,



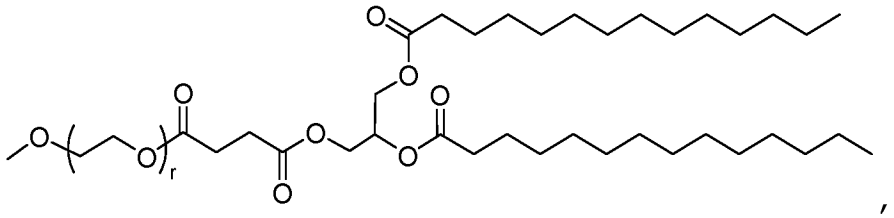
,



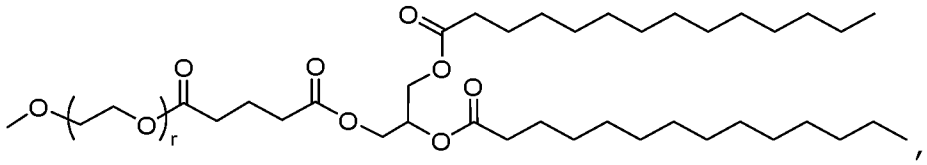
,

или его соль.

В определенных вариантах осуществления соединение формулы (**VII**) имеет одну из следующих формул:



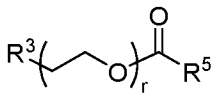
,



,

или его соли.

В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид, используемый в данном изобретении, представляет собой пегилированную жирную кислоту. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид, используемый в данном изобретении, представляет собой соединение формулы (**VIII**). В данном документе представлены соединения формулы (**VIII**):



(**VIII**),

или его соли, где:

$R^3$ представляет собой $-OR^O$;

$R^O$ представляет собой водород, необязательно замещенный алкил или защитную группу кислорода;

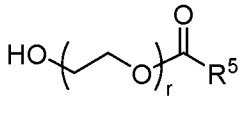
r представляет собой целое число от 1 до 100, включительно;

$R^5$ представляет собой необязательно замещенный $C_{10-40}$ алкил, необязательно замещенный $C_{10-40}$ алкенил или необязательно замещенный $C_{10-40}$ алкинил; и необязательно одну или более метиленовых групп $R^5$ заменяют необязательно замещенным карбоциклиленом, необязательно замещенным гетероциклиленом, необязательно замещенным ариленом, необязательно замещенным гетероариленом, $N(R^N)$, O, S, C(O), $C(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)$, $NR^NC(O)N(R^N)$, C(O)O, OC(O), OC(O)O, $OC(O)N(R^N)$, $NR^NC(O)O$, C(O)S,

$SC(O)$, $C(=NR^N)$, $C(=NR^N)N(R^N)$, $NR^NC(=NR^N)$, $NR^NC(=NR^N)N(R^N)$, $C(S)$, $C(S)N(R^N)$, $NR^NC(S)$, $NR^NC(S)N(R^N)$, $S(O)$, $OS(O)$, $S(O)O$, $OS(O)O$, $OS(O)_2$, $S(O)_2O$, $OS(O)_2O$, $N(R^N)S(O)$, $S(O)N(R^N)$, $N(R^N)S(O)N(R^N)$, $OS(O)N(R^N)$, $N(R^N)S(O)O$, $S(O)_2$, $N(R^N)S(O)_2$, $S(O)_2N(R^N)$, $N(R^N)S(O)_2N(R^N)$, $OS(O)_2N(R^N)$, или $N(R^N)S(O)_2O$; и

каждый пример $R^N$ независимо представляет собой водород, необязательно замещенный алкил или защитную группу азота.

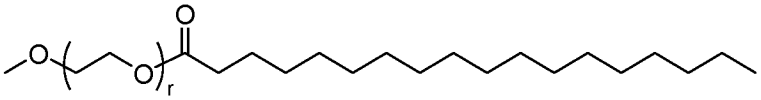
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (**VIII**) имеет формулу (**VIII-OH**):



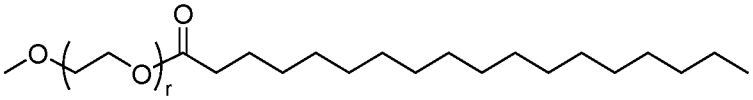
(VIII-OH),

или его соль. В некоторых вариантах осуществления r равно 45.

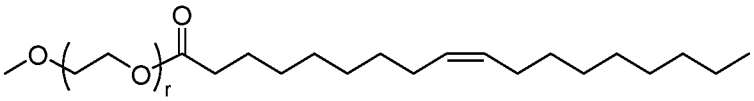
В определенных вариантах осуществления соединение формулы (**VIII**) имеет одну из следующих формул:



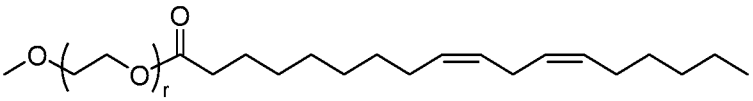
(Соединение 419),



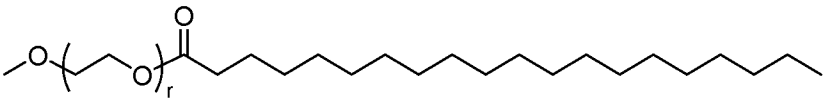
(Соединение 420),



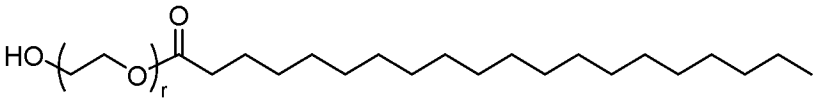
(Соединение 421),



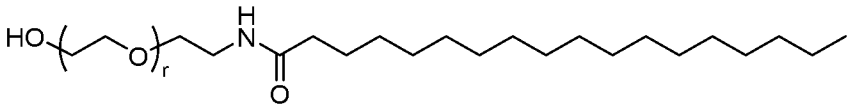
(Соединение 422),



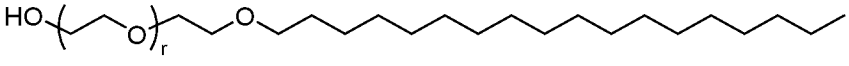
(Соединение 423),



(Соединение 424),



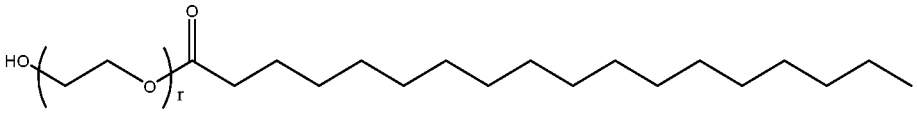
(Соединение 425),



(Соединение 426),

или его соль. В некоторых вариантах осуществления r равно 45.

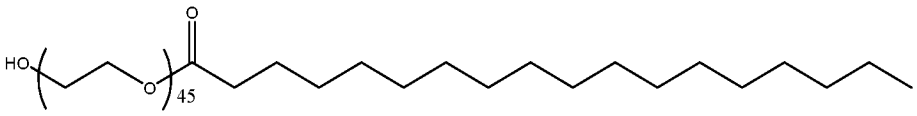
В еще других вариантах осуществления соединение формулы (**VIII**) представляет собой:



(Соединение 427),

или его соль.

В одном варианте осуществления соединение формулы (**VIII**) представляет собой



(Соединение 428).

В одном варианте осуществления количество ПЭГ-липида в липидной композиции фармацевтической композиции, раскрытой в данном документе, составляет от около 0,1 мол.% до около 5 мол.%, от около 0,5 мол.% до около 5 мол.%, от около 1 мол.% до около 5 мол.%, от около 1,5 мол.% до около 5 мол.%, от около 2 мол.% до около 5 мол.%, от около 0,1 мол.% до около 4 мол.%, от около 0,5 мол.% до около 4 мол.%, от около 1 до около 4 мол.%, от около 1,5 мол.% до около 4 мол.%, от около 2 мол.% до около 4 мол.%, от около 0,1 мол.% до около 3 мол.%, от около 0,5 мол.% до около 3 мол.%, от около 1 мол.% до около 3 мол.%, от около 1,5 мол.% до около 3 мол.%, от около 2 мол.% до около 3 мол.%, от около 0,1 мол.% до около 2 мол.%, от около 0,5 мол.% до около 2 мол.%, от около 1 мол.% до около 2 мол.%, от около 1,5 мол.% до около 2 мол.%, от около 0,1 мол.% до около 1,5 мол.%, от около 0,5 мол.% до около 1,5 мол.% или от около 1 мол.% до около 1,5 мол.%.

В одном варианте осуществления количество ПЭГ-липида в липидной композиции, раскрытой в данном документе, составляет около 2 мол.%. В одном варианте осуществления количество ПЭГ-липида в липидной композиции, раскрытой в данном документе, составляет около 1,5 мол.%.

В одном варианте осуществления количество ПЭГ-липида в липидной композиции, раскрытой в данном документе, составляет по меньшей мере около 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8,

4,9 или 5 мол. %.

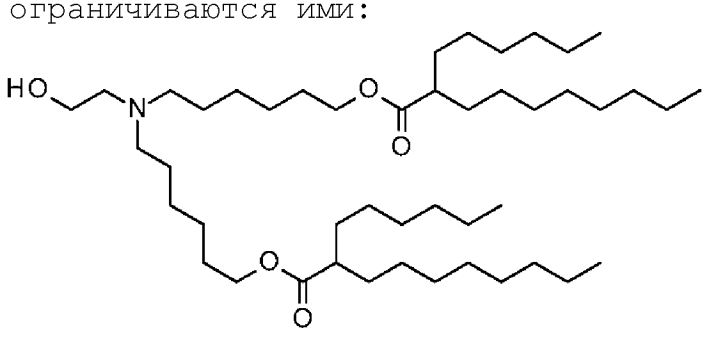
В некоторых аспектах липидная композиция фармацевтических композиций, раскрытых в данном документе, не содержит ПЭГ-липид.

**f. Другие ионизируемые аминолипиды**

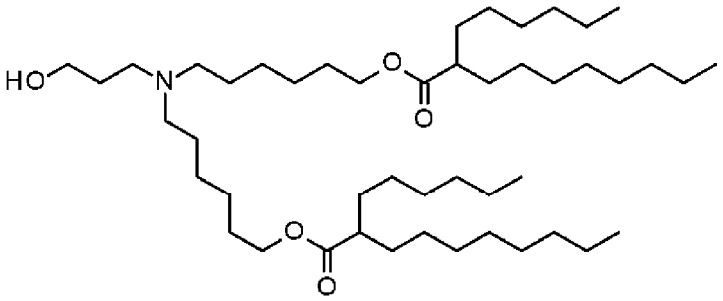
Липидная композиция фармацевтической композиции, раскрытой в данном документе, может содержать один или более ионизируемых аминолипидов в дополнение или вместо липида в соответствии с формулами (I), (II), (III), (IV), (V) или ( VI).

Ионизируемые липиды могут быть выбраны из неограничивающей группы, состоящей из 3- (дидодециламино) -N1, N1,4-тридодецил-1-пиперазинэтанамина (KL10), N1-[2- (дидодециламино)этил]N1,N4,N4 -тридодецил-1,4-пиперазиндиэтанамина (KL22), 14,25-дитридецил-15,18,21,24-тетрааза-октатриаконтана (KL25), 1,2-дилиноилилокси-N, N-диметиламинопропан (DLin-DMA), 2,2-дилинолил-4-диметиламинометил-[1,3]-диоксолана (DLin-K-DMA), гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил 4-(диметиламино)бутаноата (DLin-MC3-DMA), 2,2-дилинолеил-4-(2-диметиламиноэтил)-[1,3]-диоксолана (DLin-KC2-DMA), 1,2-диолеилокси-N, N-диметиламинопропана (DODMA), (13Z , 165Z)-N, N-диметил-3-нонидокоза-13-16-диен-1-амина (L608), 2-({8-[(3β)холест5-ен3илокси]октил}окси)-N, N-диметил-3-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]пропан-1-амина (октил-CLinDMA), (2R)-2-({8-[(3β)-холест-5-ен-3-илокси]октил}окси)-N, N-диметил-3-[(9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-илокси]пропан-1-амина (октил-CLinDMA (2R)) и (2S)-2-({8-[(3β)-холест-5ен3илокси]октил}окси)N, Nдиметил3-[(9Z,12Z)октадека 9,12диен1илокси]пропан1-амина (Octyl-CLinDMA (2S)). В дополнение к этому ионизируемый аминолипид может также представлять собой липид, содержащий циклическую аминогруппу.

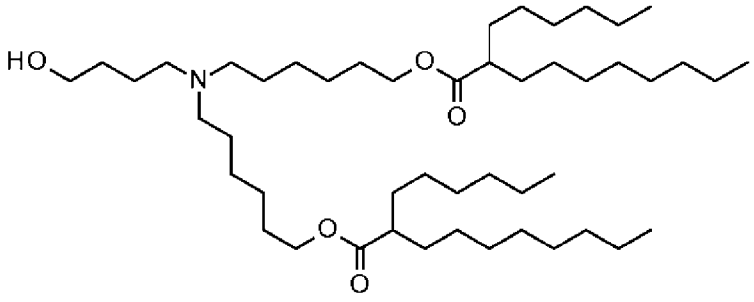
Ионизируемые липиды также могут представлять собой соединения, раскрытые в международной публикации № WO 2017/075531 A1, полностью включенной в данный документ посредством ссылки. Например, ионизируемые аминолипиды включают, но не ограничиваются ими:




;



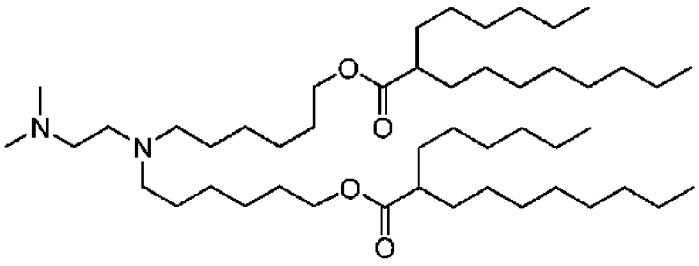
;



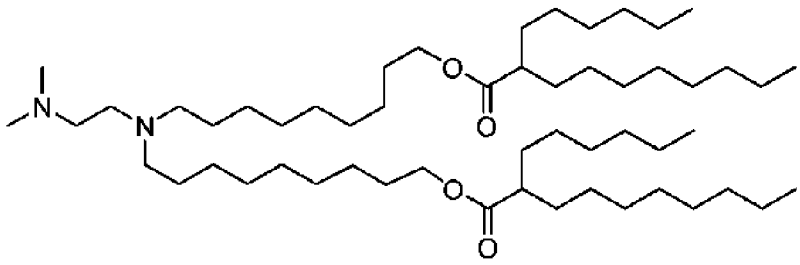
;

и любую их комбинацию.

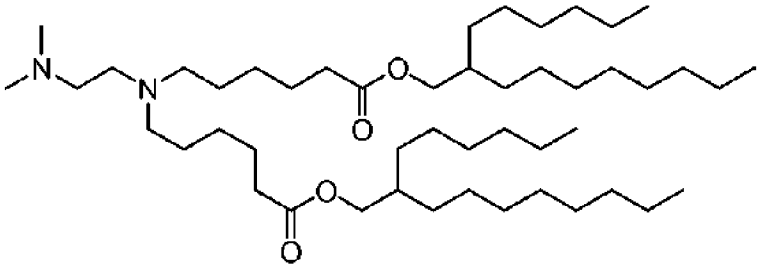
Ионизируемые липиды также могут представлять собой соединения, раскрытые в международной публикации № WO 2015/199952 A1, полностью включенной в данный документ посредством ссылки. Например, ионизируемые аминолипиды включают, но не ограничиваются ими:



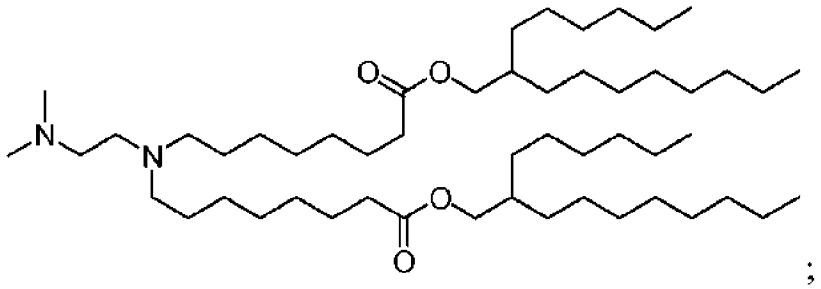
;



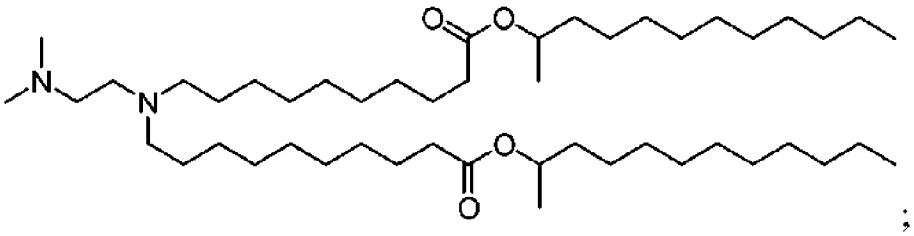
;



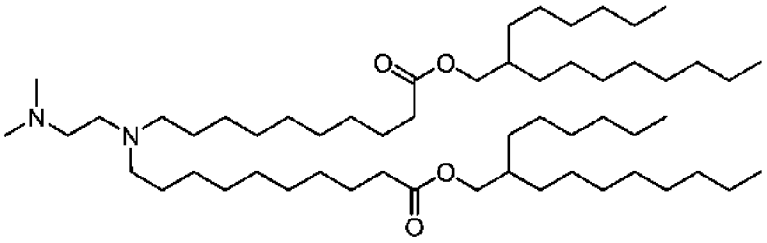
;



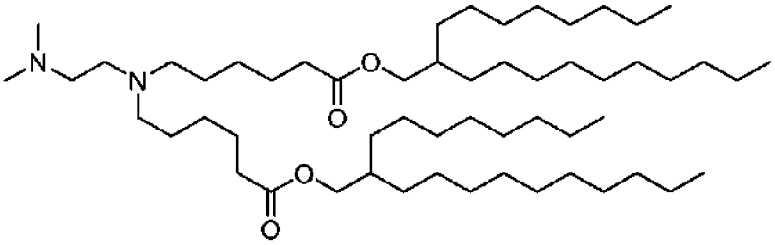
;



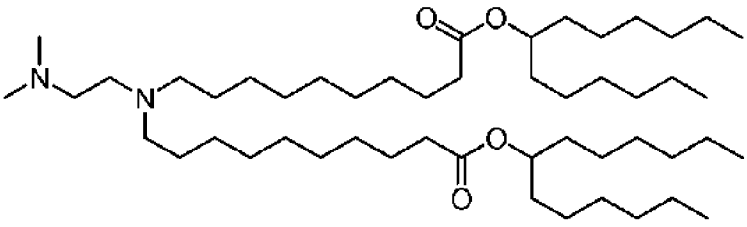
;



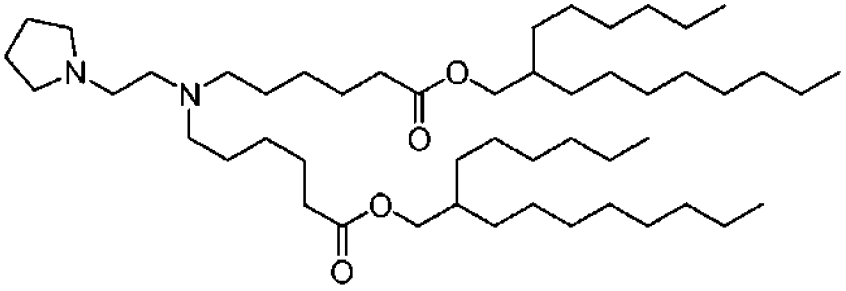
;



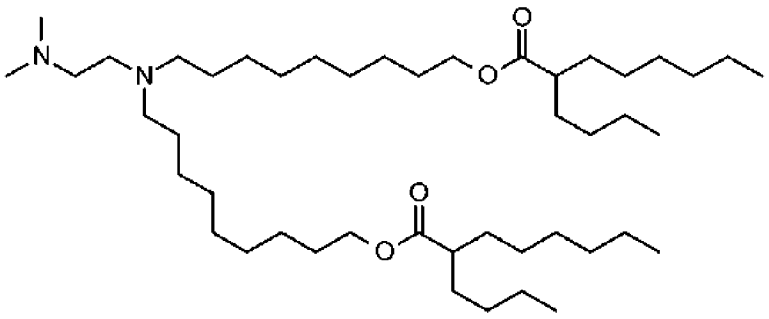
;



;



;



;

и любую их комбинацию.

**g. Композиции наночастиц**

Липидная композиция фармацевтической композиции, раскрытой в данном документе, может включать один или более компонентов в дополнение к тем, которые описаны выше. Например, липидная композиция может включать одну или более молекул усилителя проницаемости, углеводов, полимеров, агентов, изменяющих свойства поверхности, (например, поверхностно-активных веществ) или других компонентов. Например, молекула, усиливающая проницаемость, может представлять собой молекулу, описанную в публикации заявки на патент США № 2005/0222064. Углеводы могут включать простые сахара (например, глюкозу) и полисахариды (например, гликоген и его производные и аналоги).

Полимер может быть включен в и/или использован для инкапсулирования или частичного инкапсулирования фармацевтической композиции, раскрытой в данном документе, (например, фармацевтической композиции в форме липидных наночастиц). Полимер может быть биоразлагаемым и/или биосовместимым. Полимер может быть выбран из, но не ограничиваются ими, полиаминов, простых полиэфиров, полиамидов, сложных полиэфиров, поликарбаматов, полиуретанов, поликарбонатов, полистиролов, полиимидов, полисульфонов, полиуретанов, полиацетиленов, полиэтиленов, полиэтиленимининов, полиизоцианатов, полиакрилатов, полиметакрилатов, полиакрилонитрилов, и полиарилатов.

Соотношение между липидной композицией и полинуклеотидом может находиться в диапазоне от около 10:1 до около 60:1 (мас./мас.).

В некоторых вариантах осуществления соотношение между липидной композицией и полинуклеотидом может находиться в диапазоне от около 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, 20:1, 21:1, 22:1, 23:1, 24:1, 25:1, 26:1, 27:1, 28:1, 29:1, 30:1, 31:1, 32:1, 33:1, 34:1, 35:1, 36:1,

37:1, 38:1, 39:1, 40:1, 41:1, 42:1, 43:1, 44:1, 45:1, 46:1, 47:1, 48:1, 49:1, 50:1, 51:1, 52:1, 53:1, 54:1, 55:1, 56:1, 57:1, 58:1, 59:1 или 60:1 (мас./мас.). В некоторых вариантах осуществления соотношение массы липидной композиции к массе полинуклеотида, кодирующего терапевтический агент, составляет около 20:1 или около 15:1.

В одном варианте осуществления описанные в данном документе липидные наночастицы могут содержать полинуклеотиды (например, мРНК) в массовом соотношении липид:полинуклеотид 5:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, 55:1, 60:1 или 70:1, или в диапазоне или любом из этих соотношений, таких как, но не ограничиваясь, от 5:1 до около 10:1, от около 5:1 до около 15:1, от около 5:1 до около 20:1, от около 5:1 до около 25:1, от около 5:1 до около 30:1, от около 5:1 до около 35:1, от около 5:1 до около 40:1, от около 5:1 до около 45:1, от около 5:1 до около 50:1, от около 5:1 до около 55:1. от около 5:1 до около 60:1, от около 5:1 до около 70:1, от около 10:1 до около 15:1, от около 10:1 до около 20:1, от около 10:1 до около 25:1, от около 10:1 до около 30:1, от около 10:1 до около 35:1, от около 10:1 до около 40:1, от около 10:1 до около 45:1, от около 10:1 до около 50:1, от около 10:1 до около 55:1, от около 10:1 до около 60:1, от около 10:1 до около 70:1, от около 15:1 до около 20:1, от около 15:1 до около 25:1, от около 15:1 до около 30:1, от около 15:1 до около 35:1, от около 15:1 до около 40:1, от около 15:1 до около 45:1, от около 15:1 до около 50:1, от около 15:1 до около 55:1, от около 15:1 до около 60:1 или от около 15:1 до около 70:1.

В одном варианте осуществления описанные в данном документе липидные наночастицы могут содержать полинуклеотид в концентрации от около 0,1 мг/мл до 2 мг/мл, такой как, но не ограничиваясь этим, 0,1 мг/мл, 0,2 мг/мл, 0,3 мг/мл, 0,4 мг/мл, 0,5 мг/мл, 0,6 мг/мл, 0,7 мг/мл, 0,8 мг/мл, 0,9 мг/мл, 1,0 мг/мл, 1,1 мг/мл, 1,2 мг/мл, 1,3 мг/мл, 1,4 мг/мл, 1,5 мг/мл, 1,6 мг/мл, 1,7 мг/мл, 1,8 мг/мл, 1,9 мг/мл, 2,0 мг/мл или более 2,0 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, раскрытые в данном документе, составлены в виде липидных наночастиц (LNP). Соответственно, данное раскрытие также обеспечивает композиции наночастиц, содержащие (i) липидную композицию, содержащую агент доставки, такой как

соединение формулы (I) или (III), как описано в данном документе, и (ii) полинуклеотид, кодирующий представляющий интерес полипептид. В такой композиции наночастиц липидная композиция, раскрытая в данном документе, может инкапсулировать полинуклеотид, кодирующий представляющий интерес полипептид.

Композиции наночастиц обычно имеют размер порядка микрометров или меньше и могут включать липидный бислой. Композиции наночастиц охватывают липидные наночастицы (LNP), липосомы (например, липидные везикулы) и липоплексы. Например, композиция наночастиц может представлять собой липосому, имеющую липидный бислой диаметром 500 нм или менее.

Композиции наночастиц включают, например, липидные наночастицы (LNP), липосомы и липоплексы. В некоторых вариантах осуществления композиции наночастиц представляют собой везикулы, имеющие один или более липидных бислоев. В определенных вариантах осуществления композиция наночастиц имеет два или более концентрических бислоя, разделенных водными компартментами. Липидные бислоя могут быть функционализированы и/или перекрестно-сшиты друг с другом. Липидные бислоя могут содержать один или более лигандов, белков или каналов.

В некоторых вариантах осуществления композиции наночастиц согласно данному раскрытию содержат по меньшей мере одно соединение в соответствии с формулами (I), (III), (IV), (V) или (VI). Например, композиция наночастиц может содержать одно или более из соединений 1-147 или одно или более из соединений 1-342. Композиции наночастиц могут также содержать множество других компонентов. Например, композиция наночастиц может содержать один или более других липидов в дополнение к липиду в соответствии с формулами (I), (II), (III), (IV), (V) или (VI), например, (i) по меньшей мере один фосфолипид, (ii) по меньшей мере один структурный липид, (iii) по меньшей мере один ПЭГ-липид или (iv) любую их комбинацию. Включение структурного липида может быть необязательным, например, когда липиды в соответствии с формулой III используются в композициях липидных наночастиц согласно изобретению.

В некоторых вариантах осуществления композиция наночастиц содержит соединение формулы (I) (например, соединения 18, 25, 26 или 48). В некоторых вариантах осуществления композиция наночастиц содержит соединение формулы (I) (например, соединения 18, 25, 26 или 48) и фосфолипид (например, DSPC).

В некоторых вариантах осуществления композиция наночастиц содержит соединение формулы (III) (например, соединение 236). В некоторых вариантах осуществления композиция наночастиц содержит соединение формулы (III) (например, соединение 236) и фосфолипид (например, DOPE или DSPC).

В некоторых вариантах осуществления композиция наночастиц содержит липидную композицию, состоящую или состоящую по существу из соединения формулы (I) (например, соединений 18, 25, 26 или 48). В некоторых вариантах осуществления композиция наночастиц содержит липидную композицию, состоящую или состоящую по существу из соединения формулы (I) (например, соединений 18, 25, 26 или 48) и фосфолипида (например, DSPC).

В некоторых вариантах осуществления композиция наночастиц содержит липидную композицию, состоящую или состоящую по существу из соединения формулы (III) (например, соединения 236). В некоторых вариантах осуществления композиция наночастиц содержит липидную композицию, состоящую или состоящую по существу из соединения формулы (III) (например, соединения 236) и фосфолипида (например, DOPE или DSPC).

В одном варианте осуществления липидная наночастица содержит ионизируемый липид, структурный липид, фосфолипид, ПЭГ-модифицированный липид и мРНК. В некоторых вариантах осуществления LNP содержит ионизируемый липид, ПЭГ-модифицированный липид, стерин и фосфолипид. В некоторых вариантах осуществления LNP имеет мольное соотношение около 20-60% ионизируемого липида: около 5-25% фосфолипида: около 25-55% стерола; и около 0,5-15% ПЭГ-модифицированного липида. В некоторых вариантах осуществления LNP имеет мольное соотношение около 50% ионизируемого липида, около 1,5% ПЭГ-модифицированного липида, около 38,5% холестерина и около 10% фосфолипида. В некоторых вариантах осуществления LNP имеет мольное соотношение около 55% ионизируемого липида, около 2,5% ПЭГ-липида, около 32,5% холестерина и около 10% фосфолипида. В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой ионизируемый аминолипид, а нейтральный липид представляет собой фосфолипид, а стерин представляет собой холестерин. В некоторых вариантах осуществления LNP имеет мольное соотношение 50: 38,5: 10: 1,5 для ионизируемого липида: холестерина: DSPC: ПЭГ-липид. В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой соединение 18 или соединение 236, а ПЭГ-липид

представляет собой соединение 428 или ПЭГ-DMG.

В некоторых вариантах осуществления LNP имеет мольное соотношение 50: 38,5: 10: 1,5 для соединения 18: холестерина: фосфолипида: соединения 428. В некоторых вариантах осуществления LNP имеет мольное соотношение 50: 38,5: 10: 1,5 для соединения 18: холестерина: DSPC: соединения 428. В некоторых вариантах осуществления LNP имеет мольное соотношение 50: 38,5: 10: 1,5 для соединения 18: холестерина: фосфолипида: ПЭГ-DMG. В некоторых вариантах осуществления LNP имеет мольное соотношение 50: 38,5: 10: 1,5 для соединения 18: холестерина: DSPC: ПЭГ-DMG.

В некоторых вариантах осуществления LNP имеет мольное соотношение 50: 38,5: 10: 1,5 для соединения 236: холестерина: фосфолипида: соединения 428. В некоторых вариантах осуществления LNP имеет мольное соотношение 50: 38,5: 10: 1,5 для соединения 236: холестерина: DSPC: соединения 428.

В некоторых вариантах осуществления LNP имеет мольное соотношение 40: 38,5: 20: 1,5 для соединения 18: холестерина: фосфолипида: соединения 428. В некоторых вариантах осуществления LNP имеет мольное соотношение 40: 38,5: 20: 1,5 для соединения 18: холестерина: DSPC: соединения 428. В некоторых вариантах осуществления LNP имеет мольное соотношение 40: 38,5: 20: 1,5 для соединения 18: холестерина: фосфолипида: ПЭГ-DMG. В некоторых вариантах осуществления LNP имеет мольное соотношение 40: 38,5: 20: 1,5 для соединения 18: холестерина: DSPC: ПЭГ-DMG.

В некоторых вариантах осуществления композиция наночастиц может иметь состав соединения 18: фосфолипида: холестерина: соединения 428 с мольным отношением 50: 10: 38,5: 1,5. В некоторых вариантах осуществления композиция наночастиц может иметь состав соединения 18: DSPC: холестерина: соединения 428 с мольным отношением 50: 10: 38,5: 1,5. В некоторых вариантах осуществления композиция наночастиц может иметь состав соединения 18: фосфолипида: холестерина: ПЭГ-DMG с мольным отношением 50: 10: 38,5: 1,5. В некоторых вариантах осуществления композиция наночастиц может иметь состав соединения 18: DSPC: холестерина: ПЭГ-DMG с мольным отношением 50: 10: 38,5: 1,5.

В некоторых вариантах осуществления LNP имеет значение полидисперсности менее 0,4. В некоторых вариантах осуществления LNP имеет общий нейтральный заряд при нейтральном pH. В некоторых вариантах осуществления LNP имеет средний диаметр 50-

150 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP имеет средний диаметр 80–100 нм.

Как в целом определено в данном документе термин «липид» относится к малой молекуле, которая обладает гидрофобными или амфифильными свойствами. Липиды могут быть природными или синтетическими. Примеры классов липидов включают, но не ограничиваются ими, жиры, воски, стеринсодержащие метаболиты, витамины, жирные кислоты, глицеролипиды, глицерофосфолипиды, сфинголипиды, сахаролипиды и поликетиды и преноловые липиды. В некоторых случаях амфифильные свойства некоторых липидов приводят к тому, что они образуют липосомы, везикулы или мембраны в водных средах.

В некоторых вариантах осуществления липидная наночастица (LNP) может содержать ионизируемый липид. Используемый в данном документе термин «ионизируемый липид» имеет свое обычное значение в данной области техники и может относиться к липиду, содержащему один или более заряженных фрагментов. В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид может быть положительно заряженным или отрицательно заряженным. Ионизируемый липид может быть положительно заряженным, и в этом случае его можно назвать «катионным липидом». В некоторых вариантах осуществления молекула ионизируемого липида может содержать аминогруппу и может упоминаться как ионизируемые аминолипиды. Используемый в данном документе «заряженный фрагмент» представляет собой химический фрагмент, который несет формальный электронный заряд, например, одновалентный (+1 или −1), двухвалентный (+2 или −2), трехвалентный (+3 или −3) и т. д. Заряженный фрагмент может быть анионным (то есть отрицательно заряженным) или катионным (то есть положительно заряженным). Примеры положительно заряженных фрагментов включают аминогруппы (например, первичные, вторичные и/или третичные амины), аммониевые группы, пиридиниевую группу, гуанидиновые группы и имидизольные группы. В конкретном варианте осуществления заряженные фрагменты содержат аминогруппы. Примеры отрицательно заряженных групп или их предшественников включают карбоксилатные группы, сульфонатные группы, сульфатные группы, фосфонатные группы, фосфатные группы, гидроксильные группы и тому подобное. Заряд заряженного фрагмента может изменяться, в некоторых случаях, в зависимости от условий окружающей среды, например, изменения pH могут изменять заряд фрагмента и/или приводить к

тому, что фрагмент становится заряженным или незаряженным. Как правило, плотность заряда молекулы может быть выбрана по желанию.

Следует понимать, что термины «заряженный» или «заряженный фрагмент» не относятся к «частичному отрицательному заряду» или «частичному положительному заряду» в молекуле. Термины «частичный отрицательный заряд» и «частичный положительный заряд» имеют обычное значение в данной области техники. «Частичный отрицательный заряд» может возникнуть, когда функциональная группа содержит связь, которая становится поляризованной так, что электронная плотность притягивается к одному атому связи, создавая частичный отрицательный заряд на атоме. Специалисты в данной области техники, как правило, определяют связи, которые могут поляризоваться таким образом.

В некоторых вариантах осуществления ионизируемый липид представляет собой ионизируемый аминолипид, иногда называемый в данной области техники «ионизируемым катионным липидом». В одном варианте осуществления ионизируемый аминолипид может иметь положительно заряженную гидрофильную головку и гидрофобный хвост, которые связаны через линкерную структуру.

В дополнение к этому ионизируемый липид может также представлять собой липид, содержащий циклическую аминогруппу.

В одном варианте осуществления ионизируемый липид может быть выбран из, но не ограничиваясь этим, ионизируемого липида, описанного в международных публикациях №№ WO2013086354 и WO2013116126; содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

В еще одном варианте осуществления ионизируемый липид может быть выбран из формулы CLI-CLXXXII патента США № 7404969, но не ограничиваясь этим; каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

В одном варианте осуществления липид может представлять собой расщепляемый липид, такой как тот, который описан в международной публикации № WO2012170889, включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В одном варианте осуществления липид может быть синтезирован способами, известными в данной области техники и/или как описано в международных публикациях №№ WO2013086354; содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

Композиции наночастиц могут быть охарактеризованы различными способами. Например, микроскопия (например, трансмиссионная электронная микроскопия или сканирующая электронная микроскопия) может использоваться для изучения морфологии и распределения по размерам композиции наночастиц. Метод динамического рассеяния света или потенциометрия (например, потенциометрическое титрование) могут использоваться для измерения дзета-потенциалов. Метод динамического рассеяния света также может быть использован для определения размеров частиц. Такие инструменты, как Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Малверн, Вустершир, Великобритания), также могут использоваться для измерения множества характеристик композиции наночастиц, таких как размер частиц, коэффициент полидисперсности и дзета-потенциал.

В некоторых вариантах осуществления композиция наночастиц содержит липидную композицию, состоящую или состоящую по существу из соединения формулы (I) (например, соединений 18, 25, 26 или 48). В некоторых вариантах осуществления композиция наночастиц содержит липидную композицию, состоящую или состоящую по существу из соединения формулы (I) (например, соединений 18, 25, 26 или 48) и фосфолипида (например, DSPC или MSPC).

Композиции наночастиц могут быть охарактеризованы различными способами. Например, микроскопия (например, трансмиссионная электронная микроскопия или сканирующая электронная микроскопия) может использоваться для изучения морфологии и распределения по размерам композиции наночастиц. Метод динамического рассеяния света или потенциометрия (например, потенциометрическое титрование) могут использоваться для измерения дзета-потенциалов. Метод динамического рассеяния света также может быть использован для определения размеров частиц. Такие инструменты, как Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Малверн, Вустершир, Великобритания), также могут использоваться для измерения множества характеристик композиции наночастиц, таких как размер частиц, коэффициент полидисперсности и дзета-потенциал.

Размер наночастиц может помочь противодействовать биологическим реакциям, таким как, но не ограничиваясь этим, воспаление, или может увеличить биологический эффект полинуклеотида.

Используемый в данном документе термин «размер» или

«средний размер» в контексте композиций наночастиц относится к среднему диаметру композиции наночастицы.

В одном варианте осуществления полинуклеотид, кодирующий представляющий интерес полипептид, составлен в виде липидных наночастиц, имеющих диаметр от около 10 до около 100 нм, такой как, но не ограничиваясь этим, от около 10 до около 20 нм, от около 10 до около 30 нм, от около 10 до около 40 нм, от около 10 до около 50 нм, от около 10 до около 60 нм, от около 10 до около 70 нм, от около 10 до около 80 нм, от около 10 до около 90 нм, от около 20 до около 30 нм, около 20 до около 40 нм, от около 20 до около 50 нм, от около 20 до около 60 нм, от около 20 до около 70 нм, от около 20 до около 80 нм, от около 20 до около 90 нм, от около 20 до около 100 нм, от около 30 до около 40 нм, от около 30 до около 50 нм, от около 30 до около 60 нм, от около 30 до около 70 нм, от около 30 до около 80 нм, от около 30 до около 90 нм, от около 30 до около 100 нм, от около 40 до около 50 нм, от около 40 до около 60 нм, от около 40 до около 70 нм, от около 40 до около 80 нм, от около 40 до около 90 нм, от около 40 до около 100 нм, от около 50 до около 60 нм, от около 50 до около 70 нм, от около 50 до около 80 нм, от около 50 до около 90 нм, от около 50 до около 100 нм, от около 60 до около 70 нм, от около 60 до около 80 нм, от около 60 до около 90 нм, от около 60 до около 100 нм, от около 70 до около 80 нм, от около 70 до около 90 нм, от около 70 до около 100 нм, от около 80 до около 90 нм, от около 80 до около 100 нм и/или от около 90 до около 100 нм.

В одном варианте осуществления наночастицы имеют диаметр от около 10 до 500 нм. В одном варианте осуществления наночастица имеет диаметр более 100 нм, более 150 нм, более 200 нм, более 250 нм, более 300 нм, более 350 нм, более 400 нм, более 450 нм более 500 нм, более 550 нм, более 600 нм, более 650 нм, более 700 нм, более 750 нм, более 800 нм, более 850 нм, более 900 нм, более 950 нм или более 1000 нм.

В некоторых вариантах осуществления самый большой размер композиции наночастицы составляет 1 мкм или меньше (например, 1 мкм, 900 нм, 800 нм, 700 нм, 600 нм, 500 нм, 400 нм, 300 нм, 200 нм, 175 нм, 150 нм, 125 нм, 100 нм, 75 нм, 50 нм или меньше).

Композиция наночастиц может быть относительно гомогенной. Коэффициент полидисперсности может быть использован для указания гомогенности композиции наночастиц, например, распределения

частиц по размерам композиции наночастиц. Небольшой (например, менее 0,3) коэффициент полидисперсности обычно указывает на узкое распределение частиц по размерам. Композиция наночастиц может иметь коэффициент полидисперсности от около 0 до около 0,25, такой как 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,10, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,20, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24 или 0,25. В некоторых вариантах осуществления коэффициент полидисперсности композиции наночастиц, раскрытой в данном документе, может составлять от около 0,10 до около 0,20.

Дзета-потенциал композиции наночастиц можно использовать для указания электрокинетического потенциала композиции. Например, дзета-потенциал может описывать поверхностный заряд композиции наночастиц. Композиции наночастиц с относительно низкими зарядами, положительными или отрицательными, обычно желательны, так как более высоко заряженные частицы могут нежелательно взаимодействовать с клетками, тканями и другими элементами в организме. В некоторых вариантах осуществления дзета-потенциал композиции наночастиц, раскрытой в данном документе, может составлять от около −10 мВ до около +20 мВ, от около −10 мВ до около +15 мВ, от около 10 мВ до около +10 мВ, от около от −10 мВ до +5 мВ, от около −10 мВ до около 0 мВ, от около −10 мВ до около −5 мВ, от около −5 мВ до около +20 мВ, от около −5 мВ до около +15 мВ, от около −5 мВ до около +10 мВ, от около −5 мВ до около +5 мВ, от около −5 мВ до около 0 мВ, от около 0 мВ до около +20 мВ, от около 0 мВ до около+15 мВ, от около 0 мВ до около +10 мВ, от около 0 мВ до около +5 мВ, от около +5 мВ до около +20 мВ, от около +5 мВ до около +15 мВ или от около +5 мВ до +10 мВ.

В некоторых вариантах осуществления дзета-потенциал липидных наночастиц может составлять от около 0 мВ до около 100 мВ, от около 0 мВ до около 90 мВ, от около 0 мВ до около 80 мВ, от около 0 мВ до около 70 мВ, от около 0 мВ до около 60 мВ, от около 0 мВ до около 50 мВ, от около 0 мВ до около 40 мВ, от около 0 мВ до около 30 мВ, от около 0 мВ до около 20 мВ, от около 0 мВ до около 10 мВ, от около 10 мВ до около 100 мВ, от около 10 мВ до около 90 мВ, от около 10 мВ до около 80 мВ, от около 10 мВ до около 70 мВ, от около 10 мВ до около 60 мВ, от около 10 мВ до около 50 мВ, от около 10 мВ до около 40 мВ, от около 10 мВ до около 30 мВ, от около 10 мВ до около 20 мВ, от

около 20 мВ до около 100 мВ, от около 20 мВ до около 90 мВ, от около 20 до около 80 мВ, от около 20 мВ до около 70 мВ, от около 20 мВ до около 60 мВ, от около 20 мВ до около 50 мВ, от около 20 мВ до около 40 мВ, от около 20 мВ от около 30 мВ, от около 30 мВ до около 100 мВ, от 30 мВ до около 90 мВ, от около 30 мВ до около 80 мВ, от около 30 мВ до около 70 мВ, от около 30 до около 60 мВ, от около 30 мВ до около 50 мВ, от около 30 мВ до около 40 мВ, от около 40 мВ до около 100 мВ, от около 40 мВ до около 90 мВ, от около 40 мВ до около 80 мВ, от около 40 мВ до около 70 мВ, от около 40 мВ до около 60 мВ и от около 40 мВ до около 50 мВ. В некоторых вариантах осуществления дзета-потенциал липидных наночастиц может составлять от около 10 мВ до около 50 мВ, от около 15 мВ до около 45 мВ, от около 20 мВ до около 40 мВ и от около 25 мВ до около 35 мВ. В некоторых вариантах осуществления дзета-потенциал липидных наночастиц может составлять около 10 мВ, около 20 мВ, около 30 мВ, около 40 мВ, около 50 мВ, около 60 мВ, около 70 мВ, около 80 мВ, около 90 мВ и около 100 мВ.

Термин «эффективность инкапсуляции» полинуклеотида описывает количество полинуклеотида, которое инкапсулируется или иным образом связывается с композицией наночастиц после приготовления, по отношению к обеспечиваемому исходному количеству. Как используется в данном документе, «инкапсуляция» может относиться к полной, значительной или частичной капсуляции, окружению, ограничению, заключению.

Эффективность инкапсуляции является предпочтительно высокой (например, близка к 100%). Эффективность инкапсуляции может быть измерена, например, путем сравнения количества полинуклеотида в растворе, содержащем композицию наночастиц, до и после разрушения композиции наночастиц одним или более органическими растворителями или детергентами.

Флуоресценцию можно использовать для измерения количества свободного полинуклеотида в растворе. Для описанных в данном документе композиций наночастиц эффективность инкапсуляции полинуклеотида может составлять, например, по меньшей мере 50%, например, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. В некоторых вариантах осуществления эффективность инкапсуляции может составлять по меньшей мере 80%. В определенных вариантах осуществления эффективность инкапсуляции может составлять по меньшей мере 90%.

Количество полинуклеотида, присутствующего в фармацевтической композиции, раскрытой в данном документе, может зависеть от множества факторов, таких как размер полинуклеотида, желаемая мишень и/или применение или другие свойства композиции наночастиц, а также от свойств полинуклеотида.

Например, количество мРНК, полезной в композиции наночастиц, может зависеть от размера (выраженного в виде длины или молекулярной массы), последовательности и других характеристик мРНК. Относительные количества полинуклеотида в составе наночастиц также могут варьироваться.

Относительные количества липидной композиции и полинуклеотида, присутствующего в композиции липидных наночастиц согласно данному раскрытию, могут быть оптимизированы в соответствии с соображениями эффективности и переносимости. Для композиций, содержащих мРНК в качестве полинуклеотида, соотношение N:P может служить полезным показателем.

Поскольку соотношение N:P композиции наночастиц контролирует как экспрессию, так и переносимость, желательны композиции наночастиц с низким соотношением N:P и сильной экспрессией. Соотношения N:P варьируются в зависимости от соотношения липидов к РНК в композиции наночастиц.

Как правило, более низкое соотношение N:P является предпочтительным. Одна или более РНК, липидов и их количества могут быть выбраны для обеспечения соотношения N:P от около 2:1 до около 30:1, такого как 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 12:1, 14:1, 16:1, 18:1, 20:1, 22:1, 24:1, 26:1, 28:1 или 30:1. В определенных вариантах осуществления соотношение N:P может составлять от около 2:1 до около 8:1. В других вариантах осуществления соотношение N:P составляет от около 5:1 до около 8:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение N:P составляет от 5:1 до 6:1. В одном конкретном аспекте соотношение N:P составляет около 5,67:1.

В дополнение к предоставлению композиций наночастиц, данное раскрытие также обеспечивает способы получения липидных наночастиц, включающие инкапсулирование полинуклеотида. Такой способ включает использование любой из фармацевтических композиций, раскрытых в данном документе, и получение липидных наночастиц в соответствии со способами получения липидных наночастиц, известными в данной области техники. См., например, Wang et al. (2015) “Delivery of oligonucleotides with lipid

nanoparticles" Adv. Drug Deliv. Rev. 87:68-80; Silva et al. (2015) "Delivery Systems for Biopharmaceuticals. Part I: Nanoparticles and Microparticles" Curr. Pharm. Technol. 16: 940-954; Naseri et al. (2015) "Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Structure, Preparation and Application" Adv. Pharm. Bull. 5:305-13; Silva et al. (2015) "Lipid nanoparticles for the delivery of biopharmaceuticals" Curr. Pharm. Biotechnol. 16:291-302, и ссылки, цитируемые в них.

Применения, связанные с наночастицами

Было обнаружено, что иммуномодулирующие терапевтические композиции, описанные в данном документе, превосходят существующие композиции в нескольких отношениях. Во-первых, доставка липидных наночастиц (LNP) превосходит другие составы, включая подходы на основе липосом или протаминов, описанные в литературе, кроме того не требуются дополнительные адъюванты. Применение LNP обеспечивает эффективную доставку композиций химически модифицированных или немодифицированных мРНК. Составленные в LNP композиции как модифицированной, так и немодифицированной мРНК значительно превосходят обычные композиции. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующие терапевтические композиции согласно изобретению превосходят обычные композиции в 10 раз, в 20 раз, в 40 раз, в 50 раз, в 100 раз, в 500 раз или в 1000 раз.

Хотя были предприняты попытки получения функциональных РНК-вакцин, включая мРНК-вакцины и самореплицирующиеся РНК-вакцины, терапевтическая эффективность данных РНК-вакцин еще не полностью установлена. Совершенно неожиданно авторы изобретения обнаружили в соответствии с аспектами изобретения класс составов для доставки иммуномодулирующих терапевтических композиций in vivo, который приводит к значительно усиленным и во многих отношениях синергетическим иммунным ответам, включая усиленную генерацию антигена и продукцию функциональных антител с возможностью нейтрализации. Эти результаты могут быть достигнуты даже тогда, когда вводятся значительно более низкие дозы мРНК по сравнению с дозами мРНК, используемыми в других классах составов на основе липидов. Составы согласно изобретению продемонстрировали значительные неожиданные иммунные ответы in vivo, достаточные для установления эффективности функциональных композиций мРНК в качестве иммуномодулирующих терапевтических агентов. Кроме того, самореплицирующиеся РНК-вакцины основаны на путях репликации

вируса, чтобы доставить достаточное количество РНК в клетку для получения иммуногенного ответа. Составы согласно изобретению не требуют репликации вируса для продукции достаточного количества белка для получения сильного иммунного ответа. Таким образом, мРНК согласно раскрытию не является самореплицирующейся РНК и не включает компоненты, необходимые для репликации вируса.

Изобретение включает, в некоторых аспектах, неожиданное открытие, что составы липидных наночастиц (LNP) значительно повышают эффективность композиций мРНК, включая химически модифицированные и немодифицированные иммуномодулирующие терапевтические композиции мРНК. Эффективность мРНК-содержащих иммуномодулирующих терапевтических композиций, составленных в LNP, исследовали in vivo с использованием нескольких различных опухолевых антигенов. Помимо обеспечения усиленного иммунного ответа, составы согласно изобретению генерируют более быстрый иммунный ответ с меньшим количеством доз антигена, чем другие испытанные композиции. Составы мРНК-LNP согласно изобретению также дают количественно и качественно лучшие иммунные ответы, чем составы, приготовленные на разных носителях. Кроме того, композиции мРНК-LNP согласно изобретению превосходят другие композиции, даже когда доза мРНК ниже, чем у других композиций.

LNP, используемую в описанных в данном документе исследованиях, ранее использовали для доставки киРНК в различных животных моделях, а также на людях. Принимая во внимание наблюдения, сделанные в связи с доставкой киРНК составов LNP, тот факт, что LNP полезен в иммуномодулирующих терапевтических композициях для лечения рака, является довольно неожиданным. Наблюдалось, что терапевтическая доставка киРНК, составленной в LNP, вызывает нежелательный воспалительный ответ, связанный с временным ответом IgM, обычно приводящим к снижению продукции антигена и ослабленному иммунному ответу. В отличие от результатов, обнаруженных для киРНК, в данном документе продемонстрировано, что составы LNP-мРНК согласно изобретению генерируют повышенные уровни IgG, достаточные для профилактических и терапевтических способов, а не временные ответы IgM.

**Фармацевтические композиции**

Данное раскрытие включает фармацевтические композиции, содержащие мРНК или наночастицу (например, липидную наночастицу), описанные в данном документе, в комбинации с одним

или более фармацевтически приемлемыми наполнителями, носителями или разбавителями. В конкретных вариантах осуществления мРНК присутствует в наночастице, например, в липидной наночастице. В конкретных вариантах осуществления мРНК или наночастица присутствует в фармацевтической композиции. В различных вариантах осуществления одна или более мРНК, присутствующих в фармацевтической композиции, инкапсулированы в наночастицу, например, в липидную наночастицу. В конкретных вариантах осуществления мольное соотношение первой мРНК ко второй мРНК составляет около 1:50, около 1:25, около 1:10, около 1:5, около 1:4, около 1:3, около 1:2, около 1:1, около 2:1, около 3:1, около 4:1 или около 5:1, около 10:1, около 25:1 или около 50:1. В конкретных вариантах осуществления мольное соотношение первой мРНК ко второй мРНК превышает 1:1.

В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, содержит мРНК, кодирующую представляющий интерес антиген (Аг), и мРНК, кодирующую полипептид, который усиливает иммунный ответ на представляющий интерес антиген (например, иммуностимулятор, например, полипептид STING) (ИС), причем мРНК, кодирующую представляющий интерес антиген (Аг), и мРНК, кодирующую полипептид, который усиливает иммунный ответ на представляющий интерес антиген (например, иммуностимулятор, например, полипептид STING) (ИС), вводят в состав в массовом соотношении Аг: ИС 1: 1, 2: 1, 3: 1, 4: 1, 5: 1, 6: 1, 7: 1, 8: 1, 9: 1, 10: 1 или 20: 1 (или, альтернативно, массовое соотношение ИС: Аг 1: 1, 1: 2, 1: 3, 1: 4, 1: 5, 1: 6, 1: 7, 1: 8, 1: 9, 1:10 или 1:20). В некоторых вариантах осуществления композиция составлена при массовом соотношении Аг:ИС 1:1. 1,25:1, 1,50:1, 1,75:1, 2,0:1, 2,25:1, 2,50:1, 2,75:1, 3,0:1, 3,25:1, 3,50:1, 3,75:1, 4,0:1, 4,25:1, 4,50:1, 4,75:1 или 5:1 мРНК, кодирующей представляющий интерес антиген, к мРНК, кодирующей полипептид, который усиливает иммунитет к представляющему интерес антигену (например, иммуностимулятор, например, полипептид STING). В некоторых вариантах осуществления композицию вводят в состав в массовом соотношении 5: 1 мРНК, кодирующей представляющий интерес антиген, к мРНК, кодирующей полипептид, который усиливает иммунитет к представляющему интерес антигену (например, иммуностимулятор, например, полипептид STING) (массовое соотношение Аг: ИС составляет 5: 1 или, альтернативно, массовое соотношение ИС: Аг составляет 1:

5). В некоторых вариантах осуществления композицию вводят в состав в массовом соотношении 10: 1 мРНК, кодирующей представляющий интерес антиген, к мРНК, кодирующей полипептид, который усиливает иммунитет к представляющему интерес антигену (например, иммуностимулятор, например, полипептид STING) (массовое соотношение Аг: ИС составляет 10: 1 или, альтернативно, массовое соотношение ИС: Аг составляет 1: 0).

В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в данном документе, содержит мРНК, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, и мРНК, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека, причем мРНК, кодирующая KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, и мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 1: 1, 2: 1, 3: 1, 4: 1, 5: 1, 6: 1, 7: 1, 8: 1, 9: 1, 10: 1 или 20: 1 или, альтернативно, в массовом соотношении STING: KRAS 1: 1, 1: 2, 1: 3, 1: 4, 1: 5, 1: 6, 1: 7, 1: 8, 1: 9, 1: 10 или 1: 20. В некоторых вариантах осуществления мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 1: 1. 1,25:1, 1,50:1, 1,75:1, 2,0:1, 2,25:1, 2,50:1, 2,75:1, 3,0:1, 3,25:1, 3,50:1, 3,75:1, 4,0:1, 4,25:1, 4,50:1, 4,75:1 или 5:1 мРНК, кодирующей представляющий интерес антиген, к мРНК, кодирующей полипептид, который усиливает иммунитет к представляющему интерес антигену (например, иммуностимулятор, например, полипептид STING). В некоторых вариантах осуществления мРНК присутствуют в массовом соотношении 5: 1 мРНК, кодирующей KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, к мРНК, кодирующей конститутивно активный полипептид STING человека (массовое соотношение KRAS: STING 5: 1 или, альтернативно, массовое соотношение STING: KRAS 1: 5). В некоторых вариантах осуществления мРНК присутствуют в массовом соотношении 10: 1 мРНК, кодирующей KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, к мРНК, кодирующей конститутивно активный полипептид STING человека (массовое соотношение KRAS: STING 10: 1 или, альтернативно, массовое соотношение STING: KRAS 1: 10).

Фармацевтические композиции могут необязательно содержать одно или более дополнительных активных веществ, например, терапевтически и/или профилактически активные вещества. Фармацевтические композиции согласно данному раскрытию могут быть стерильными и/или апирогенными. Общие подходы по составлению и/или изготовлению фармацевтических агентов можно

найти, например, в *Remington*: *The Science and Practice of Pharmacy* 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005 (включенной во всей полноте в данный документ посредством ссылки). В конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит мРНК и липидную наночастицу или их комплексы.

Составы фармацевтических композиций, описанных в данном документе, могут быть получены любым способом, известным или разработанным в дальнейшем в области фармакологии. В целом, такие способы приготовления могут включать стадию объединения активного ингредиента с наполнителем или одним или более другими вспомогательными ингредиентами, а затем, при необходимости, и/или желательно, разделения, формования и/или упаковку продукта в желаемую емкость однократной или многократной дозы.

Относительные количества активного ингредиента, фармацевтически приемлемого наполнителя и/или любых дополнительных ингредиентов в фармацевтической композиции в соответствии с раскрытием будут варьироваться в зависимости от индивидуальных особенностей, телосложения и/или состояния субъекта, которого лечат, и, кроме того, в зависимости от пути введения композиции. Например, композиция может включать от 0,1% до 100%, например, от 0,5% до 70%, от 1% до 30%, от 5% до 80% или по меньшей мере 80% (мас./мас.) активного ингредиента.

мРНК согласно раскрытию могут быть составлены с использованием одного или более наполнителей для: (1) повышения стабильности; (2) увеличения трансфекции клеток; (3) обеспечения пролонгированного или отсроченного высвобождения (например, из депо-препарата мРНК); (4) изменения биораспределения (например, нацеливания мРНК на конкретные ткани или типы клеток); (5) увеличения трансляции полипептида, кодируемого мРНК in vivo; и/или (6) изменения профиля высвобождения полипептида, кодируемого мРНК in vivo. В дополнение к традиционным наполнителям, таким как любые и все растворители, дисперсионные среды, разбавители или другие жидкие носители, дисперсионные или суспензионные добавки, поверхностно-активные агенты, изотонические агенты, загущающие или эмульгирующие агенты, консерванты, носители согласно данному раскрытию могут включать, без ограничений, липидоиды, липосомы, липидные наночастицы (например, липосомы и мицеллы), полимеры, липоплексы, наночастицы типа ядро/оболочка, пептиды, белки, углеводы,

клетки, трансфицированные мРНК (например, для трансплантации субъекту), гиалуронидазу, аналоги наночастиц и их комбинации. Соответственно, составы согласно раскрытию могут содержать один или более наполнителей, каждый в количестве, которое вместе увеличивает стабильность мРНК, увеличивает трансфекцию клеток мРНК, увеличивает экспрессию полипептида, кодируемого мРНК, и/или изменяет профиль высвобождения мРНК-кодируемого полипептида. Кроме того, мРНК согласно данному раскрытию могут быть составлены с использованием самособирающихся наночастиц нуклеиновых кислот.

Различные носители для составления фармацевтических композиций и способы приготовления композиции известны в данной области техники (см. Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Edition, A. R. Gennaro, Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006; включенных во всей полноте в данный документ посредством ссылки). Применение среды со стандартным наполнителем может рассматриваться в рамках объема данного раскрытия, за исключением того, что любая среда со стандартным наполнителем может быть несовместима с веществом или его производными, например, вызывая любой нежелательный биологический эффект или иным вредным образом взаимодействуя с любым другим компонентом(ами) фармацевтической композиции. Наполнители могут включать, например: антиадгезивы, антиоксиданты, связывающие вещества, покрывающие вещества, добавки для прессования, разрыхлители, красящие вещества (красители), средства для смягчения, эмульгаторы, наполнители (разбавители), пленкообразователи или покрывающие вещества, вещества, способствующие скольжению (усилители сыпучести), смазывающие вещества, консерванты, печатные краски, сорбенты, суспендирующие или диспергирующие средства, подсластители и гидратационную воду. Иллюстративные наполнители включают, без ограничения, следующие: бутилированный гидрокситолуол (BHT), карбонат кальция, фосфат кальция (двухосновный), стеарат кальция, кросскармелозу, сшитый поливинилпирролидон, лимонную кислоту, кросповидон, цистеин, этилцеллюлозу, желатин, гидроксипропилцеллюлозу гидроксипропилметилцеллюлозу, лактозу, стеарат магния, мальтит, маннит, метионин, метилцеллюлозу, метилпарабен, микрокристаллическую целлюлозу, полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, повидон, прежелатинизированный крахмал, пропилпарабен, ретинилпальмитат, шеллак, диоксид кремния,

натрий-карбоксиметилцеллюлозу, цитрат натрия, натрий-гликолят крахмала, сорбит, крахмал (кукурузный), стеариновую кислоту, сахарозу, тальк, диоксид титана, витамин А, витамин Е, витамин С и ксилит.

В некоторых вариантах осуществления составы, описанные в данном документе, могут содержать по меньшей мере одну фармацевтически приемлемую соль. Примеры фармацевтически приемлемых солей, которые могут быть включены в состав согласно раскрытию, включают, но не ограничиваются ими, кислотно-аддитивные соли, соли щелочных или щелочноземельных металлов, соли минеральных или органических кислот основных остатков, таких как амины; щелочные или органические соли кислотных остатков, таких как карбоновые кислоты; и тому подобное. Репрезентативные кислотно-аддитивные соли включают ацетат, уксусную кислоту, адипинат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензолсульфоновую кислоту, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанепропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидробромид, гидрохлорид, гидроиодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, толуолсульфонат, ундеканоат, валерианат и тому подобное. Репрезентативные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают соли натрия, лития, калия, кальция, магния и тому подобное, а также нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и амина, включая, но не ограничиваясь этим, аммоний, тетраметиламмоний, тетраэтиламмоний, метиламин, диметиламин, триметиламин, триэтиламин, этиламин и тому подобное.

В некоторых вариантах осуществления составы, описанные в данном документе, могут содержать по меньшей мере один тип полинуклеотида. В качестве неограничивающего примера, составы могут содержать 1, 2, 3, 4, 5 или более 5 мРНК, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления составы, описанные в данном документе, могут содержать по меньшей мере одну мРНК, кодирующую полипептид, и по меньшей мере одну

последовательность нуклеиновой кислоты, такую как, но не ограничиваясь этим, киРНК, кшРНК, мякРНК и миРНК.

Жидкие лекарственные формы, например, для парентерального введения, включают, но не ограничиваются ими, фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, наноэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и/или эликсиры. В дополнение к активным ингредиентам, жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, обычно применяемые в настоящем уровне техники, например, такие как вода или другие растворители, солюбилизирующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, масло зародышей пшеницы, оливковое, касторовое и кунжутное масло), глицерин, тетрагидрофурфуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот и сорбитана, а также их смеси. Помимо инертных разбавителей композиции для перорального применения могут дополнительно содержать адъюванты, такие как смачивающие агенты, эмульгаторы и суспендирующие агенты. В некоторых вариантах осуществления для парентерального введения композиции смешивают с солюбилизирующими агентами, такими как CREMAPHOR®, спирты, масла, модифицированные масла, гликоли, полисорбаты, циклодекстрины, полимеры и/или их комбинации.

Инъекционные формы, например, стерильные инъецируемые водные или масляные суспензии, могут быть приготовлены в соответствии с известным уровнем техники с использованием подходящих диспергирующих агентов, смачивающих агентов и/или суспендирующих агентов. Стерильные инъекционные формы могут представлять собой стерильные инъекционные растворы, суспензии и/или эмульсии в нетоксичных парентерально приемлемых разбавителях и/или растворителях, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. Среди приемлемых носителей и растворителей, которые могут быть использованы, – вода, раствор Рингера, U.S.P. (Фармакопея США), и изотонический раствор хлорида натрия. Стерильные, нелетучие масла традиционно используются в качестве растворителя или суспендирующей среды. Для данной цели можно использовать любое нелетучее масло со слабовыраженным вкусом, включая синтетические моно- или диглицериды. Жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, могут быть использованы при

приготовлении инъекционных растворов. Инъекционные составы можно стерилизовать, например, путем фильтрации через задерживающий бактерии фильтр и/или путем включения стерилизующих агентов в форме стерильных твердых композиций, которые можно растворять или диспергировать в стерильной воде или другой стерильной инъекционной среде непосредственно перед применением.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, включающие по меньшей мере одну мРНК, описанную в данном документе, вводят млекопитающим (например, людям). Хотя описания фармацевтических композиций, представленные в данном документе, в основном направлены на фармацевтические композиции, которые подходят для введения людям, специалисту в данной области техники должно быть понятно, что такие композиции обычно подходят для введения любому другому животному, например, млекопитающему, отличному от человека. Модификация фармацевтических композиций, подходящих для введения людям для того, чтобы сделать композиции, подходящие для введения различным животным, хорошо понятна, и квалифицированный ветеринарный фармаколог может разработать и/или выполнить такую модификацию с помощью обычных, если таковые имеются, экспериментов. Субъекты, которым предполагается введение фармацевтических композиций, включают, но не ограничиваются ими, людей и/или других приматов; млекопитающих, включая коммерчески значимых млекопитающих, таких как крупный рогатый скот, свиньи, лошади, овцы, кошки, собаки, мыши и/или крысы; и/или птиц, включая коммерчески значимых птиц, таких как домашняя птица, куры, утки, гуси и/или индейки. В конкретных вариантах осуществления субъекту предоставляют две или более мРНК, описанные в данном документе. В конкретных вариантах осуществления первую и вторую мРНК предоставляют субъекту одновременно или в разное время, например, последовательно. В конкретных вариантах осуществления первую и вторую мРНК предоставляют субъекту в одной и той же фармацевтической композиции или составе, например, для облегчения поглощения обеих мРНК одними и теми же клетками.

Данное раскрытие также включает наборы, содержащие контейнер, содержащий мРНК, кодирующую полипептид, который усиливает иммунный ответ. В другом варианте осуществления набор содержит контейнер, содержащий мРНК, кодирующую полипептид, который усиливает иммунный ответ, а также одну или более

дополнительных мРНК, кодирующих один или более представляющих интерес антигенов. В других вариантах осуществления набор содержит первый контейнер, содержащий мРНК, кодирующую полипептид, который усиливает иммунный ответ, и второй контейнер, содержащий одну или более мРНК, кодирующих один или более представляющих интерес антигенов. В конкретных вариантах осуществления мРНК для усиления иммунного ответа и мРНК, кодирующие антиген(ы), присутствуют в одинаковых или разных наночастицах и/или фармацевтических композициях. В конкретных вариантах осуществления мРНК лиофилизируют, сушат или сушат сублимацией.

**Способы усиления иммунных ответов**

Раскрытие обеспечивает способ усиления иммунного ответа на представляющий интерес антиген у субъекта, например, у человека. В одном варианте осуществления способ включает введение субъекту композиции согласно раскрытию (или ее липидной наночастицы, или ее фармацевтической композиции), содержащей по меньшей мере один конструкт мРНК, кодирующий: (i) по меньшей мере один представляющий интерес антиген и (ii) полипептид, который усиливает иммунный ответ против представляющего интерес антигена(ов), так что повышается иммунный ответ на представляющий интерес антиген(ы). В одном варианте осуществления усиление иммунного ответа включает стимуляцию продукции цитокинов. В другом варианте осуществления усиление иммунного ответа включает усиление клеточного иммунитета (Т-клеточных ответов), такое как стимуляция антигенспецифической активности $CD8^+$ Т-клеток, стимуляция антигенспецифической активности $CD4^+$ Т-клеток или увеличение процента эффекторных $CD62L^{lo}$ Т-клеток памяти. В другом варианте осуществления усиление иммунного ответа включает усиление гуморального иммунитета (В-клеточных ответов), такого как стимуляция продукции антигенспецифических антител.

В одном варианте осуществления способа иммуностимуляторная мРНК кодирует полипептид, который стимулирует сигнальный путь интерферона I типа (например, иммуностимулятор кодирует полипептид, такой как STING, IRF3, IRF7 или любой из дополнительных иммуностимуляторов, описанных в данном документе). В другом варианте осуществления способа иммуностимулятор кодирует полипептид, который стимулирует сигнальный путь NFkB, стимулирует воспалительный ответ или

стимулирует развитие, активность или мобилизацию дендритных клеток. В одном варианте осуществления способ включает введение субъекту композиции мРНК, которая стимулирует развитие, активность или мобилизацию дендритных клеток, перед введением субъекту композиции мРНК, которая стимулирует сигнальный путь интерферона I типа. Например, композицию мРНК, которая стимулирует развитие или активность дендритных клеток, можно вводить за 1–30 суток, например, за 3 суток, 5 суток, 7 суток, 10 суток, 14 суток, 21 сутки, 28 суток до введения композиции мРНК, что стимулирует сигнальный путь интерферона типа I.

Усиление иммунного ответа у субъекта против представляющего интерес антигена(ов) с помощью иммуностимулятора согласно раскрытию может быть оценено различными способами, установленными в данной области техники для оценки иммунных ответов, включая, но не ограничиваясь, способы, описанные в Примерах. Например, в различных вариантах осуществления усиление оценивают по уровням внутриклеточного окрашивания (ICS) $CD8^+$ клеток на ИФН-γ или ФНО-α, процентному содержанию селезеночных или периферических $CD8b^+$ клеток или процентному содержанию селезеночных или периферических эффекторных $CD62L^{lo}$ клеток памяти.

Композиции согласно раскрытию вводят субъекту в эффективном количестве. В общем, эффективное количество композиции позволит эффективно продуцировать кодированный полипептид в клетке. Показатели эффективности могут включать трансляцию полипептида (обозначенную посредством экспрессии полипептида), уровень деградации мРНК и показатели иммунного ответа.

**Терапевтические способы**

Способы раскрытия для усиления иммунного ответа на представляющий интерес антиген(ы) у субъекта, могут быть использованы в различных клинических или терапевтических применениях. Например, способы могут быть использованы для стимуляции противоопухолевого иммунитета у субъекта с опухолью. Соответственно, в одном аспекте раскрытие относится к способу стимуляции иммуногенного ответа на опухоль у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту композиции согласно раскрытию (или ее липидной наночастицы, или ее фармацевтической композиции) содержащей по меньшей мере один конструкт мРНК, кодирующий: (i) по меньшей мере один представляющий интерес опухолевый антиген и (ii) полипептид,

который усиливает иммунный ответ против представляющего интерес опухолевого антигена(ов), так что повышается иммунный ответ на представляющий интерес опухолевый антиген(ы). Подходящие представляющие интерес опухолевые антигены включают те, которые описаны в данном документе (например, опухолевые неоантигены, включая мутантные антигены KRAS). В одном варианте осуществления способа субъекту вводят конструкт мРНК мутантный антиген KRAS-STING, кодирующий последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 107-130.

Раскрытие также обеспечивает способы лечения или профилактики рака у субъекта, нуждающегося в этом, которые включают обеспечение или введение по меньшей мере одной композиции мРНК, описанной в данном документе (то есть иммуностимуляторной мРНК и мРНК, кодирующей антиген, в том же или отдельных конструктах мРНК) субъекту. В связанных вариантах осуществления субъекту предоставляют или вводят наночастицу (например, липидную наночастицу), содержащую мРНК. В других связанных вариантах осуществления субъекту предоставляют или вводят фармацевтическую композицию согласно раскрытию субъекту. В конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит мРНК, кодирующую антиген и иммуностимуляторный полипептид, как описано в данном документе, или она содержит наночастицу, содержащую мРНК. В конкретных вариантах осуществления мРНК присутствует(ют) в наночастице, например, в липидной наночастице. В конкретных вариантах осуществления мРНК или наночастица присутствует в фармацевтической композиции.

В определенных вариантах осуществления субъекту, нуждающемуся в этом, был поставлен диагноз рак или считается, что он подвержен риску развития рака. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак печени, колоректальный рак, меланому, рак поджелудочной железы, НМРЛ, рак шейки матки, или рак головы или шеи. В конкретных вариантах осуществления рак печени представляет собой гепатоцеллюлярную карциному. В некоторых вариантах осуществления колоректальный рак представляет собой первичную опухоль или метастазы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гематопоэтический рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронический миеломоноцитарный лейкоз, миелодистрофический синдром (в том числе рефрактерные анемии и рефрактерные

цитопении) или миелопролиферативные новообразования или болезни (в том числе истинную полицитемию, эссенциальный тромбоцитоз и первичный миелофиброз). В других вариантах осуществления рак представляет собой рак крови или гематопоэтический рак. Селективность в отношении определенного типа рака может быть достигнута путем комбинации использования подходящего состава LNP (например, нацеливания на конкретные типы клеток) в комбинации с соответствующим регуляторным сайтом(ами) (например, микроРНК), встроенным в конструкт мРНК.

В некоторых вариантах осуществления мРНК, наночастицы или фармацевтическую композицию вводят пациенту парентерально. В конкретных вариантах осуществления субъект является млекопитающим, например, человеком. В различных вариантах субъекту предоставляют эффективное количество мРНК.

Способы лечения рака могут дополнительно включать лечение субъекта дополнительными агентами, которые усиливают противоопухолевый ответ у субъекта и/или которые являются цитотоксичными для опухоли (например, химиотерапевтические агенты). Подходящие терапевтические агенты для применения в комбинированной терапии включают низкомолекулярные химиотерапевтические агенты, включая ингибиторы протеинтирозинкиназы, а также биологические противораковые агенты, такие как противораковые антитела, включая, но не ограничиваясь, те, которые обсуждаются ниже. Комбинированная терапия может включать введение субъекту ингибитора иммунной контрольной точки для усиления противоопухолевого иммунитета, такой как ингибиторы PD-1, ингибиторы PD-L1 и ингибиторы CTLA-4. Другие модуляторы иммунных контрольных точек могут быть нацелены на OX-40, OX-40L или ICOS. В одном варианте осуществления агент, который модулирует иммунную контрольную точку, представляет собой антитело. В другом варианте осуществления агент, который модулирует иммунную контрольную точку, представляет собой белок или низкомолекулярный модулятор. В другом варианте осуществления агент (такой как мРНК) кодирует модулятор-антитело иммунной контрольной точки. Неограничивающие примеры ингибиторов иммунной контрольной точки, которые можно использовать в комбинированной терапии, включают пембролизумаб, алемтузумаб, ниволумаб, пидилизумаб, офатумумаб, ритуксимаб, MEDI0680 и PDR001, AMP-224, PF-06801591, BGB-A317, REGN2810, SHR-1210, TSR-042, аффимер, авелумаб (MSB0010718C), атезолизумаб (MPDL3280A), дурвалумаб

(MEDI4736), BMS936559, ипилимумаб, тремелимумаб, AGEN1884, MEDI6469 и MOXR0916.

Фармацевтическая композиция, содержащая одну или более мРНК согласно раскрытию, может быть введена субъекту любым подходящим путем. В некоторых вариантах осуществления композиции согласно раскрытию вводят одним или более различными путями, включая парентеральный (например, подкожной, внутрикожной, внутривенной, внутрибрюшинной, внутримышечной, внутрисуставной, внутриартериальной, интрасиновиальной, интрастернальной, интратекальной, внутриочаговой или внутричерепной инъекции а также с помощью любой подходящей техники инфузии), пероральный, транс- или интрадермальный, интердермальный, ректальный, интравагинальный, местный (например, с помощью порошков, мазей, кремов, гелей, лосьонов и/или капель), мукозальный, назальный, буккальный, энтеральный, витреальный, внутриопухолевый, сублингвальный, интраназальный; путем интратрахеальной инстилляции, бронхиальной инстилляции и/или ингаляции; в виде орального спрея и/или порошка, назального спрея и/или аэрозоля, и/или через катетер для воротной вены. В некоторых вариантах осуществления композицию можно вводить внутривенно, внутримышечно, внутрикожно, внутриартериально, внутриопухолево, подкожно или путем ингаляции. В некоторых вариантах композицию вводят внутримышечно. Однако данное раскрытие охватывает доставку композиций согласно раскрытию любым подходящим способом, принимая во внимание вероятные достижения в области доставки лекарств. В общем, наиболее подходящий путь введения будет зависеть от множества факторов, включая природу фармацевтической композиции, содержащей одну или более мРНК (например, ее стабильность в различных средах организма, таких как кровоток и желудочно-кишечный тракт), и состояние пациента (например, способен ли пациент переносить определенные пути введения).

В определенных вариантах осуществления композиции согласно раскрытию могут вводиться в дозах, достаточных для доставки от около 0,0001 мг/кг до около 10 мг/кг, от около 0,001 мг/кг до около 10 мг/кг, от около 0,005 мг/кг до около 10 мг/кг, от около 0,01 мг/кг до около 10 мг/кг, от около 0,1 мг/кг до около 10 мг/кг, от около 1 мг/кг до около 10 мг/кг, от около 2 мг/кг до около 10 мг/кг, от около 5 мг/кг до около 10 мг/кг, от около 0,0001 мг/кг до около 5 мг/кг, от около 0,001 мг/кг до около 5

мг/кг, от около 0,005 мг/кг до около 5 мг/кг, от около 0,01 мг/кг до около 5 мг/кг, от около 0,1 мг/кг до около 10 мг/кг, от около 1 мг/кг до около 5 мг/кг, от около 2 мг/кг до около 5 мг/кг, от около 0,0001 мг/кг до около 1 мг/кг, от около 0,001 мг/кг до около 1 мг/кг, от около 0,005 мг/кг до около 1 мг/кг, от около 0,01 мг/кг до около 1 мг/кг, или от около 0,1 мг/кг до около 1 мг/кг в данной дозе, причем доза в 1 мг/кг обеспечивает 1 мг мРНК или наночастиц на 1 кг массы тела субъекта. В конкретных вариантах осуществления может быть введена доза от около 0,005 мг/кг до около 5 мг/кг мРНК или наночастиц согласно раскрытию.

Дозу могут вводить один или более раз в сутки в том же или другом количестве для достижения желаемого уровня экспрессии мРНК и/или эффекта (например, терапевтического эффекта). Желаемую дозу можно доставлять, например, три раза в сутки, два раза в сутки, один раз в сутки, через сутки, каждые третьи сутки, каждую неделю, каждые две недели, каждые три недели или каждые четыре недели. В некоторых вариантах осуществления желаемая доза может быть доставлена с использованием нескольких способов введения (например, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, одиннадцати, двенадцати, тринадцати, четырнадцати или более введений). В некоторых вариантах осуществления однократную дозу можно вводить, например, до или после хирургической процедуры или в случае острого заболевания, расстройства или патологического состояния. Конкретный терапевтически эффективный, профилактически эффективный или иным образом подходящий уровень дозы для любого конкретного пациента будет зависеть от множества факторов, включая степень тяжести и идентификацию подлежащего лечению расстройства, если таковое имеется; одну или более используемых мРНК; конкретную применяемую композицию; возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и рацион пациента; время введения, путь введения и скорость выведения конкретной применяемой фармацевтической композиции; продолжительность лечения; препараты, применяемые в комбинации или совмещающиеся с конкретной применяемой фармацевтической композицией; и подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

Иммуномодулирующие терапевтические композиции РНК (например, мРНК) и липидные наночастицы согласно раскрытию могут быть введены любым путем, который приводит к терапевтически

эффективному результату. Они включают, но не ограничиваются ими, внутрикожное, внутримышечное, интраназальное и/или подкожное введение. Данное раскрытие обеспечивает способы, включающие введение композиций РНК и липидных наночастиц согласно раскрытию субъекту, нуждающемуся в этом. Точное требуемое количество будет варьироваться от субъекта к субъекту, в зависимости от вида, возраста и общего состояния субъекта, серьезности заболевания, конкретной композиции, способа ее введения, способа ее действия и тому подобного. Композиции РНК и липидные наночастицы согласно раскрытию обычно готовят в виде единичной дозированной формы для простоты введения и однородности дозы. Однако следует понимать, что общее ежедневное применение композиций РНК (например, мРНК) будет определяться лечащим врачом в рамках обоснованного медицинского заключения. Конкретный терапевтически эффективный, профилактически эффективный или подходящий уровень дозы визуализации для любого конкретного пациента будет зависеть от множества факторов, включая расстройство, подлежащее лечению, и тяжесть расстройства; активность конкретного используемого соединения; конкретный используемый состав; возраст, масса тела, общее состояние здоровья, пол и диета пациента; время введения, способ введения и скорость выведения конкретного используемого соединения; продолжительность лечения; лекарственные средства, используемые в комбинации или одновременно с конкретным применяемым соединением; и подобные факторы, хорошо известные в медицине.

Эффективное количество композиции РНК или липидной наночастицы согласно раскрытию, как указано в данном документе, может составлять всего 10 мкг, вводимых, например, в виде однократной дозы или в виде двух доз по 5 мкг. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой общую дозу от 10 мкг до 300 мкг. Например, эффективное количество может представлять собой общую дозу 10 мкг, 20 мкг, 25 мкг, 30 мкг, 35 мкг, 40 мкг, 45 мкг, 50 мкг, 55 мкг, 60 мкг, 65 мкг, 70 мкг, 75 мкг, 80 мкг, 85 мкг, 90 мкг, 95 мкг, 100 мкг, 110 мкг, 120 мкг, 130 мкг, 140 мкг, 150 мкг, 160 мкг, 170 мкг, 180 мкг, 190 мкг или 200 мкг, 210 мкг, 220 мкг, 230 мкг, 240 мкг, 250 мкг, 260 мкг, 270 мкг, 280 мкг, 290 мкг или 300 мкг. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой общую дозу от 10 мкг до 300 мкг. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет

собой общую дозу 30 мкг–100 мкг или 50 мкг–200 мкг.

В некоторых вариантах осуществления композиции РНК (например, мРНК) и липидные наночастицы можно вводить в дозах, достаточных для доставки от 0,0001 мг/кг до 100 мг/кг, от 0,001 мг/кг до 0,05 мг/кг, от 0,005 мг/кг до 0,05 мг/кг, от 0,001 до 0,005 мг/кг, от 0,05 до 0,5 мг/кг, от 0,01 до 50 мг/кг, от 0,1 до 40 мг/кг, от 0,5 до 30 мг/кг, от 0,01 мг/кг до 10 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 10 мг/кг или от 1 мг/кг до 25 мг/кг массы тела субъекта в сутки, один или более раз в сутки в неделю в месяц и т. д. для получения желаемого терапевтического, диагностического, профилактического или визуализирующего эффекта (см., например, диапазон единичных доз, описанный в международной публикации № WO2013078199, полностью включенной в данном документ посредством ссылки). Желаемую дозу можно доставлять три раза в сутки, два раза в сутки, один раз в день, через сутки, каждые третьи сутки, каждую неделю, каждые две недели, каждые три недели, каждые четыре недели, каждые 2 месяца, каждые три месяца, каждые 6 месяцев и т. д. В определенных вариантах осуществления желаемую дозу можно доставить с использованием нескольких введений (например, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, одиннадцати, двенадцати, тринадцати, четырнадцати или более введений). Когда применяют несколько введений, могут использоваться схемы раздельного применения, такие как описанные в данном документе. В иллюстративных вариантах осуществления композиции РНК (например, мРНК) можно вводить в дозах, достаточных для доставки от 0,0005 мг/кг до 0,01 мг/кг, например, от около 0,0005 мг/кг до около 0,0075 мг/кг, например, около 0,0005 мг/кг, около 0,001 мг/кг, около 0,002 мг/кг, около 0,003 мг/кг, около 0,004 мг/кг или около 0,005 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления композиции РНК (например, мРНК) можно вводить один или два раза (или более) при уровнях дозы, достаточных для доставки от 0,025 мг/кг до 0,250 мг/кг, от 0,025 мг/кг до 0,500 мг/кг, 0,025 мг/кг до 0,750 мг/кг или от 0,025 мг/кг до 1,0 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления композиции РНК (например, мРНК) можно вводить дважды (например, на 0-е сутки и 7-е сутки, 0-е сутки и 14-е сутки, 0-е сутки и 21-е сутки, 0-е сутки и 28-е сутки, 0-е сутки и 60-е сутки, 0-е сутки и 90-е сутки, 0-е сутки и 120-е сутки, 0-е сутки и 150-е сутки, 0-е

сутки и 180-е сутки, 0-е сутки и через 3 месяца, 0-е сутки и через 6 месяцев, 0-е сутки и через 9 месяцев, 0-е сутки и через 12 месяцев, 0-е сутки и через 18 месяцев, 0-е сутки и через 2 года, 0-е сутки и через 5 лет или на 0-е сутки и через 10 лет) в общей дозе или на уровнях доз, достаточных для доставки общей дозы 0,0100 мг, 0,025 мг, 0,050 мг, 0,075 мг, 0,100 мг, 0,125 мг, 0,150 мг, 0,175 мг, 0,200 мг, 0,225 мг, 0,250 мг, 0,275 мг, 0,300 мг, 0,325 мг, 0,350 мг, 0,375 мг, 0,400 мг, 0,425 мг, 0,450 мг, 0,475 мг, 0,500 мг, 0,525 мг, 0,550 мг, 0,575 мг, 0,600 мг, 0,625 мг, 0,650 мг, 0,675 мг, 0,700 мг, 0,725 мг, 0,750 мг, 0,775 мг, 0,800 мг, 0,825 мг, 0,850 мг, 0,875 мг, 0,900 мг, 0,925 мг, 0,950 мг, 0,975 мг или 1,0 мг. Более высокие и более низкие дозы и частота введения охватываются данным раскрытием. Например, композицию РНК (например, мРНК) можно вводить три или четыре раза.

В некоторых вариантах осуществления композиции РНК (например, мРНК) или липидные наночастицы, содержащие их, можно вводить дважды (например, на 0-е сутки и 7-е сутки, 0-е сутки и 14-е сутки, 0-е сутки и 21-е сутки, 0-е сутки и 28-е сутки, 0-е сутки и 60-е сутки, 0-е сутки и 90-е сутки, 0-е сутки и 120-е сутки, 0-е сутки и 150-е сутки, 0-е сутки и 180-е сутки, 0-е сутки и через 3 месяца, 0-е сутки и через 6 месяцев, 0-е сутки и через 9 месяцев, 0-е сутки и через 12 месяцев, 0-е сутки и через 18 месяцев, 0-е сутки и через 2 года, 0-е сутки и через 5 лет или на 0-е сутки и через 10 лет) в общей дозе или на уровнях доз, достаточных для доставки общей дозы 0,010 мг, 0,025 мг, 0,100 мг или 0,400 мг.

В некоторых вариантах осуществления композицию РНК (например, мРНК) или липидные наночастицы, содержащие их, для применения в способе вакцинации субъекта, вводят субъекту однократно в дозе от 10 мкг/кг до 400 мкг/кг вакцины на основе нуклеиновой кислоты в эффективном количестве для вакцинации субъекта. В некоторых вариантах осуществления композицию РНК или липидные наночастицы, содержащие ее, для применения в способе вакцинации субъекта, вводят субъекту однократно в дозе от 10 мкг до 400 мкг вакцины на основе нуклеиновой кислоты в эффективном количестве для вакцинации субъекта. В некоторых вариантах осуществления композицию РНК (например, мРНК) или липидные наночастицы, содержащие ее, для применения в способе вакцинации субъекта вводят субъекту в виде однократной дозы 25-1000 мкг

(например, однократной дозы мРНК, кодирующей антиген). В некоторых вариантах осуществления композицию РНК вводят субъекту в виде однократной дозы 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800 , 850, 900, 950 или 1000 мкг. Например, композицию РНК можно вводить субъекту в виде однократной дозы 25–100, 25–500, 50–100, 50–500, 50–1000, 100–500, 100–1000, 250–500, 250 –1000 или 500–1000 мкг. В некоторых вариантах осуществления композицию РНК (например, мРНК) или липидные наночастицы, содержащие ее, для применения в способе вакцинации субъекта вводят субъекту в виде двух доз, комбинация которых равна 25–1000 мкг композиции РНК (например, мРНК).

Композиция РНК (например, мРНК) или липидные наночастицы, содержащие ее, как описано в данном документе, может быть составлена в лекарственную форму, описанную в данном документе, такую как интраназальная, интратрахеальная или инъекционная (например, внутривенная, интраокулярная, интравитреальная, внутримышечная, внутрикожная, интракардиальная, интраперитонеальная и подкожная).

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию согласно раскрытию можно вводить в комбинации с другим агентом, например, другим терапевтическим агентом, профилактическим агентом и/или диагностическим агентом. Под «в комбинации с» не подразумевается, что агенты должны вводить одновременно и/или составлять для совместной доставки, хотя эти способы доставки находятся в объеме данного раскрытия. Например, одну или более композиций, содержащих одну или более разных мРНК, можно вводить в комбинации. Композиции можно вводить одновременно, до или после одной или более других необходимых терапевтических средств или медицинских процедур. Каждый дополнительный фармацевтический агент можно вводить в дозе и/или по схеме, определенной для данного фармацевтического агента. В некоторых вариантах осуществления данное раскрытие охватывает доставку композиций согласно раскрытию или их композиций для визуализации, диагностики или профилактики в комбинации с агентами, которые улучшают их биодоступность, уменьшают и/или модифицируют их метаболизм, ингибируют их выведение и/или модифицируют их распределение в организме.

Иллюстративные терапевтические агенты, которые можно вводить в комбинации с композициями согласно раскрытию, включают, но не ограничиваются ими, цитотоксические,

химиотерапевтические и другие терапевтические агенты. Цитотоксические агенты могут включать, например, таксол, цитохалазин B, грамицидин D, бромид этидия, эметин, митомицин, этопозид, тенипозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол, пуромицин, майтанзиноиды, рахелмицин и их аналоги. Радиоактивные ионы также могут быть использованы в качестве терапевтических агентов и могут включать, например, радиоактивный йод, стронций, фосфор, палладий, цезий, иридий, кобальт, иттрий, самарий и празеодим. Другие терапевтические агенты могут включать, например, антиметаболиты (например, метотрексат, 6меркаптопурин, 6тиогуанин, цитарабин, и 5фторурацил, и декарбазин), алкилирующие агенты (например, мехлорэтамин, тиотепа, хлорамбуцил, рахелмицин, мелфалан, кармустин, ломустин, циклофосфамид, бусульфан, дибромманнит, стрептозотоцин, митомицин C, и цис-дихлородиамминплатина (II) (DDP), и цисплатин), антрациклины (например, даунорубицин и доксорубицин), антибиотики (например, дактиномицин, блеомицин, митрамицин и антрамицин), и антимитотические агенты (например, винкристин, винбластин, таксол и майтанзиноиды).

Конкретная комбинация методов лечения (терапевтических средств или процедур) для применения в комбинированном режиме будет учитывать совместимость необходимых терапевтических средств и/или процедур и желаемого терапевтического эффекта, который должен быть достигнут. Также должно быть понятно, что применяемые методы лечения могут достигать желаемого эффекта при том же расстройстве (например, композиция, полезная для лечения рака, может вводиться одновременно с химиотерапевтическим средством), или они могут достигать различных эффектов (например, контроль любых нежелательных явлений).

Ингибиторы иммунных контрольных точек, такие как пембролизумаб или ниволумаб, которые нацелены на взаимодействие между рецептором программируемой смерти 1/лигандом 1 белка программируемой смерти (PD-1/PD-L1) и PD-L2, недавно были одобрены для лечения различных злокачественных новообразований и в настоящее время исследуется в клинических испытаниях в отношении различных онкологических заболеваний, включая меланому, плоскоклеточный рак головы и шеи (HNSCC).

Соответственно, один аспект раскрытия относится к комбинированной терапии, в которой субъекта предварительно лечат антагонистом PD-1 до введения липидной наночастицы или композиции согласно данному раскрытию. В другом аспекте субъекта лечили моноклональным антителом, которое связывается с PD-1, до введения липидной наночастицы или композиции согласно данному раскрытию. В другом аспекте субъекту вводили липидную наночастицу или композицию согласно раскрытию до проведения терапии моноклональными анти-PD-1 антителами. В некоторых аспектах терапия моноклональными анти-PD-1 антителами включает ниволумаб, пембролизумаб, пидилизумаб или любую их комбинацию. В некоторых аспектах моноклональное анти-PD-1 антитело включает пембролизумаб.

В другом аспекте субъекта лечили моноклональным антителом, которое связывается с PD-L1, до введения липидной наночастицы или композиции согласно данному раскрытию. В другом аспекте субъекту вводят липидную наночастицу или композицию до проведения терапии моноклональными анти-PD-L1 антителами. В некоторых аспектах терапия моноклональными анти-PD-L1 антителами включает дурвалумаб, авелумаб, MEDI473, BMS-936559, азолизумаб или любую их комбинацию.

В некоторых аспектах субъект лечился антагонистом CTLA-4 до лечения композициями согласно данному раскрытию. В другом аспекте субъекта предварительно лечили моноклональным антителом, которое связывается с CTLA-4, до введения липидной наночастицы или композиции согласно данному раскрытию. В некоторых аспектах субъекту вводили липидную наночастицу или композицию перед лечением моноклональным анти-CTLA-4 антителом. В некоторых аспектах терапия анти-CTLA-4 антителами включает ипилимумаб или тремелимумаб.

В любом из предшествующих или связанных аспектов раскрытие обеспечивает липидную наночастицу и необязательный фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтическую композицию для применения в лечении или задержке прогрессирования рака у индивидуума, причем лечение включает введение композиции в комбинации со второй композицией, при этом вторая композиция содержит полипептид-ингибитор контрольной точки и необязательный фармацевтически приемлемый носитель.

В любом из предшествующих или связанных аспектов раскрытие обеспечивает использование липидной наночастицы и

необязательного фармацевтически приемлемого носителя при изготовлении лекарственного средства для лечения или задержки прогрессирования рака у индивидуума, причем лекарственное средство содержит липидную наночастицу и необязательный фармацевтически приемлемый носитель, и при этом лечение включает введение лекарственного средства в комбинации с композицией, содержащей полипептид-ингибитор контрольной точки и необязательный фармацевтически приемлемый носитель.

В любом из предшествующих или связанных аспектов раскрытие обеспечивает набор, содержащий контейнер, содержащий липидную наночастицу и необязательный фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтическую композицию, и листок-вкладыш, содержащий инструкции по введению липидной наночастицы или фармацевтической композиции для лечения или задержки прогрессирования рака у индивидуума. В некоторых аспектах листок-вкладыш дополнительно содержит инструкции по введению липидной наночастицы или фармацевтической композиции в комбинации с композицией, содержащей полипептид-ингибитор контрольных точек и необязательный фармацевтически приемлемый носитель для лечения или задержки прогрессирования рака у индивидуума.

В любом из предшествующих или связанных аспектов раскрытие обеспечивает набор, содержащий лекарственное средство, содержащее липидную наночастицу и необязательный фармацевтически приемлемый носитель, или фармацевтическую композицию и листок-вкладыш, содержащий инструкции по введению лекарственного средства отдельно или в комбинации с композицией, содержащей полипептид-ингибитор контрольных точек и необязательный фармацевтически приемлемый носитель для лечения или задержки прогрессирования рака у индивидуума. В некоторых аспектах набор дополнительно содержит листок-вкладыш, содержащий инструкции по введению первого лекарственного средства до, во время или после введения второго лекарственного средства для лечения или задержки прогрессирования рака у индивидуума.

В любом из предшествующих или связанных аспектов раскрытие обеспечивает липидную наночастицу, композицию или их применение, или набор, содержащий липидную наночастицу или композицию, как описано в данном документе, при этом полипептид-ингибитор контрольных точек ингибирует PD1, PD-L1, CTLA4 или их комбинацию. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой антитело. В некоторых

аспектах полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой антитело, выбранное из анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает CTLA4, анти-PD1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает PD1, анти-PD-L1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает PD-L1, и их комбинацию. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой анти-PD-L1 антитело, выбранное из атезолизумаба, авелумаба или дурвалумаба. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой анти-CTLA-4 антитело, выбранное из тремелимумаба или ипилимумаба. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой анти-PD1 антитело, выбранное из ниволумаба или пембролизумаба. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой анти-PD1 антитело, причем анти-PD1 антитело представляет собой пембролизумаб.

В связанных аспектах раскрытие обеспечивает способ снижения или уменьшения размера опухоли, или ингибирования роста опухоли у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту любой из вышеуказанных или связанных липидных наночастиц согласно раскрытию, или любой из вышеуказанных или связанных композиций согласно раскрытию.

В связанных аспектах раскрытие обеспечивает способ индукции противоопухолевого ответа у субъекта, страдающего раком, включающий введение субъекту любой из вышеуказанных или связанных липидных наночастиц согласно раскрытию, или любой из вышеуказанных или связанных композиций согласно раскрытию. В некоторых аспектах противоопухолевый ответ включает Т-клеточный ответ. В некоторых аспектах Т-клеточный ответ включает CD8+ Т-клетки.

В некоторых аспектах вышеупомянутых способов способ дополнительно включает введение второй композиции, содержащей полипептид-ингибитор контрольной точки и необязательный фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольных точек ингибирует PD1, PD-L1, CTLA4 или их комбинацию. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой антитело. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой антитело, выбранное из анти-CTLA4 антитела

или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает CTLA4, анти-PD1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает PD1, анти-PD-L1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает PD-L1, и их комбинацию. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой анти-PD-L1 антитело, выбранное из атезолизумаба, авелумаба или дурвалумаба. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой анти-CTLA-4 антитело, выбранное из тремелимумаба или ипилимумаба. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой анти-PD1 антитело, выбранное из ниволумаба или пембролизумаба. В некоторых аспектах полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой анти-PD1 антитело, причем анти-PD1 антитело представляет собой пембролизумаб.

В некоторых аспектах любого из вышеуказанных или связанных способов композицию, содержащую полипептид-ингибитор контрольной точки, вводят при помощи внутривенной инъекции. В некоторых аспектах композицию, содержащую полипептид-ингибитор контрольной точки, вводят один раз каждые 2-3 недели. В некоторых аспектах композицию, содержащую полипептид-ингибитор контрольной точки, вводят один раз каждые 2 недели или один раз каждые 3 недели. В некоторых аспектах композицию, содержащую полипептид-ингибитор контрольной точки, вводят до, одновременно или после введения липидной наночастицы или ее фармацевтической композиции.

В некоторых аспектах любого из вышеуказанных или связанных способов субъект имеет гистологически подтвержденную мутацию KRAS, выбранную из G12D, G12V, G13D или G12C.

В некоторых аспектах любого из вышеуказанных или связанных способов у субъекта имеется метастатический колоректальный рак.

В некоторых аспектах любого из вышеуказанных или связанных способов субъект имеет немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ).

В некоторых аспектах любого из вышеуказанных или связанных способов у субъекта имеется рак поджелудочной железы.

В любом из предшествующих или связанных аспектов раскрытие обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую липидную наночастицу и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых аспектах фармацевтическую композицию составляют для внутримышечной доставки.

**Другие варианты осуществления раскрытия**

E1. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция, содержащая:

одну или более мРНК, каждая из которых имеет открытую рамку считывания, кодирующую пептид с активирующей онкогенной мутацией;

одну или более мРНК, каждая из которых имеет открытую рамку считывания, кодирующую полипептид, который усиливает иммунный ответ на пептид с активирующей онкогенной мутацией у субъекта, причем иммунный ответ включает клеточный или гуморальный иммунный ответ, характеризующийся:

(i) стимуляцией сигнального пути интерферона I типа,

(ii) стимуляцией сигнального пути NFkB,

(iii) стимуляцией воспалительного ответа,

(iv) стимуляцией продукции цитокинов,

(v) стимуляцией развития, активности или мобилизации дендритных клеток, и

(vi) комбинацией любого из (i)-(v); и

фармацевтически приемлемый носитель.

E2. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция согласно варианту осуществления 1, в которой активирующая онкогенная мутация представляет собой мутацию KRAS.

E3. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 2, в которой мутация KRAS представляет собой мутацию G12.

E4. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 3, в которой мутацию KRAS G12 выбирают из мутаций KRAS G12D, G12V, G12S, G12C, G12A и G12R.

E5. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 3, в которой мутацию KRAS G12 выбирают из мутаций KRAS G12D, G12V и G12C.

E6. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 2-5, в которой мутация KRAS представляет собой мутацию G13.

E7. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 6, в которой мутация KRAS G13 представляет собой мутацию KRAS G13D.

E8. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 1, в которой активирующая онкогенная мутация представляет собой мутацию H-RAS или N-RAS.

E9. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому

из вариантов осуществления 1-8, в которой мРНК имеет открытую рамку считывания, кодирующую конкатемер из двух или более пептидов с активирующей онкогенной мутацией.

E10. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 9, в которой конкатемер содержит 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 пептидов с активирующей онкогенной мутацией.

E11. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 9, в которой конкатемер содержит 4 пептида с активирующей онкогенной мутацией.

E12. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 11, в которой конкатемер содержит KRAS-пептиды с активирующей онкогенной мутацией G12D, G12V, G12C и G13D.

E13. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 12, в которой конкатемер содержит от N- к C-концу G12D, G12V, G13D и G12C.

E14. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 12, в которой конкатемер содержит от N- к C-концу G12C, G13D, G12V и G12D.

E15. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1-8, в которой композиция содержит 1, 2, 3 или 4 мРНК, кодирующие 1, 2, 3 или 4 пептида с активирующей онкогенной мутацией.

E16. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 15, в которой композиция содержит 4 мРНК, кодирующих 4 пептида с активирующей онкогенной мутацией.

E17. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 16, в которой 4 мРНК кодируют KRAS-пептиды с активирующей онкогенной мутацией G12D, G12V, G12C и G13D.

E18. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1-17, в которой пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 10-30, 15-25 или 20-25 аминокислот.

E19. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 18, в которой пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислот.

E20. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 19, в которой пептид с активирующей

онкогенной мутацией имеет длину 25 аминокислот.

E21. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1–20, в которой мРНК, кодирующая полипептид, который усиливает иммунный ответ на пептид с активирующей онкогенной мутацией у субъекта, кодирует конститутивно активный полипептид STING человека.

E22. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 21, в которой конститутивно активный полипептид STING человека содержит одну или более мутаций, выбранных из группы, состоящей из V147L, N154S, V155M, R284M, R284K, R284T, E315Q, R375A и их комбинаций.

E23. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 22, в которой конститутивно активный полипептид STING человека содержит мутацию V155M.

E24. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 22, в которой конститутивно активный полипептид STING человека содержит мутации V147L/N154S/V155M.

E25. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 22, в которой конститутивно активный полипептид STING человека содержит мутации R284M/V147L/N154S/V155M.

E26. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 22, в которой конститутивно активный полипептид STING человека содержит аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 1–10 и 164.

E27. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 21–26, в которой мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит 3'-НТО, содержащую по меньшей мере один сайт связывания микроРНК miR-122.

E28. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1–20, в которой мРНК, кодирующая полипептид, который усиливает иммунный ответ на пептид с активирующей онкогенной мутацией у субъекта, кодирует конститутивно активный полипептид IRF3 человека.

E29. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 28, в которой конститутивно активный полипептид IRF3 человека содержит мутацию S396D.

E30. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по

варианту осуществления 28, в которой конститутивно активный полипептид IRF3 человека содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12.

E31. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1-20, в которой мРНК, кодирующая полипептид, который усиливает иммунный ответ на пептид с активирующей онкогенной мутацией у субъекта, кодирует конститутивно активный полипептид IRF7 человека.

E32. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 31, в которой конститутивно активный полипептид IRF7 человека содержит одну или более мутаций, выбранных из группы, состоящей из S475D, S476D, S477D, S479D, L480D, S483D, S487D, делеции аминокислот 247-467, делеции аминокислотных остатков 152-246, делеции аминокислотных остатков 1-151, и их комбинации.

E33. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 31, в которой конститутивно активный полипептид IRF7 человека содержит аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 14-18.

E34. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1-33, в которой композиция дополнительно содержит противораковый терапевтический агент.

E35. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1-33, в которой композиция дополнительно содержит полипептид-ингибитор контрольной точки.

E36. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 35, в которой полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой антитело или его фрагмент, который специфически связывается с молекулой, выбранной из группы, состоящей из PD-1, PD-L1, TIM-3, VISTA, A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, IDO, KIR и LAG3.

E37. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1-33, в которой мРНК вводят в состав липидной наночастицы.

E38. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 37, в которой липидная наночастица имеет мольное соотношение около 20-60% ионизируемого аминолипида: 5-25% фосфолипида: 25-55% стерола; и содержит 0,5-15% ПЭГ-модифицированного липида.

E39. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по

варианту осуществления 38, в которой ионизируемый аминолипид выбирают из группы, состоящей, например, из, 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана (DLin-KC2-DMA), дилинолеил-метил-4-диметиламинобутирата (DLin-MC3-DMA), и ди((Z)-нон-2-ен-1-ил) 9-((4-(диметиламино)бутаноил)окси)гептадеканедиоата (L319).

E40. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 1-39, в которой каждая мРНК содержит по меньшей мере одну химическую модификацию.

E41. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 40, в которой химическую модификацию выбирают из группы, состоящей из псевдоуридина, N1-метилпсевдоуридина, 2-тиоуридина, 4'-тиоуридина, 5-метилцитозина, 2-тио-1-метил-1-дезазапсевдоуридина, 2-тио-1-метилпсевдоуридина, 2-тио-5-азауридина, 2-тиодигидропсевдоуридина, 2-тиодигидроуридина, 2-тиопсевдоуридина, 4-метокси-2-тиопсевдоуридина, 4-метоксипсевдоуридина, 4-тио-1-метилпсевдоуридина, 4-тиопсевдоуридина, 5-азауридина, дигидропсевдоуридина, 5-метилуридина, 5-метилуридина, 5-метоксиуридина, и 2'-О-метилуридина.

E42. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция, содержащая:

одну или более мРНК, каждая из которых имеет открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией;

одну или более мРНК, каждая из которых имеет открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека; и

фармацевтически приемлемый носитель.

E43. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 42, в которой конститутивно активный полипептид STING человека содержит мутацию V155M.

E44. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 43, в которой конститутивно активный полипептид STING человека содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1.

E45. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 42-44, в которой мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека,

содержит 3'-НТО, содержащую по меньшей мере один сайт связывания микроРНК miR-122.

E46. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 42-45, в которой KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией выбирают из G12D, G12V, G12S, G12C, G12A, G12R и G13D.

E47. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 46, в которой KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией выбирают из G12D, G12V, G12C и G13D.

E48. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 42-47, в которой мРНК имеет открытую рамку считывания, кодирующую конкатемер из двух или более KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией.

E49. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 48, в которой конкатемер содержит 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией.

E50. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 49, в которой конкатемер содержит 4 KRAS-пептида с активирующей онкогенной мутацией.

E51. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 50, в которой конкатемер содержит G12D, G12V, G12C и G13D.

E52. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 51, в которой конкатемер содержит от N- к C-концу G12D, G12V, G13D и G12C.

E53. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 51, в которой конкатемер содержит от N- к C-концу G12C, G13D, G12V и G12D.

E54. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 42-47, в которой композиция содержит 1, 2, 3 или 4 мРНК, кодирующих 1, 2, 3 или 4 KRAS-пептида с активирующей онкогенной мутацией.

E55. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 54, в которой композиция содержит 4 мРНК, кодирующие 4 KRAS-пептида с активирующей онкогенной мутацией.

E56. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 54, в которой 4 KRAS-пептида с активирующей онкогенной мутацией содержат G12D, G12V, G12C и G13D.

E57. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 42-56, в которой KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 10-30, 15-25 или 20-25 аминокислот.

E58. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 57, в которой KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислот.

E59. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 58, в которой пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 25 аминокислот.

E60. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 51, в которой конкатемер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, указанной в SEQ ID NO: 42-47, 73 и 137.

E61. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 51, в которой мРНК, кодирующая конкатемер, содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, указанной в SEQ ID NO: 129-131, 133 и 138.

E62. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 54, в которой KRAS-пептиды с активирующей онкогенной мутацией содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, указанной в SEQ ID NO: 36-41, 72 и 125.

E63. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 54, в которой KRAS-пептиды с активирующей онкогенной мутацией содержат аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 39-41.

E64. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 55, в которой KRAS-пептиды с активирующей онкогенной мутацией содержат аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 39-41 и 72.

E65. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 63, в которой мРНК, кодирующая KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, указанной в SEQ ID NO: 126-128.

E66. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 64, в которой мРНК, кодирующая KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержит нуклеотидные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 126-128 и 132.

E67. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 42-66, в которой мРНК вводят в состав одной и той же или разных липидных наночастиц.

E68. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 67, в которой каждую мРНК, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, вводят в состав одной и той же или разных липидных наночастиц.

E69. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 68, в которой каждую мРНК, кодирующую конститутивно активный STING человека, вводят в состав одной и той же или разных липидных наночастиц.

E70. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 68-69, в которой каждую мРНК, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, вводят в состав одной и той же липидной наночастицы, и каждую мРНК, кодирующую конститутивно активный STING человека, вводят в состав разных липидных наночастиц.

E71. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 68-69, в которой каждую мРНК, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, вводят в состав одной и той же липидной наночастицы, и каждую мРНК, кодирующую конститутивно активный STING человека, вводят в состав одной и той же липидной наночастицы, как и каждую мРНК, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией.

E72. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 68-69, в которой каждую мРНК, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, вводят в состав разных липидных наночастиц, и каждую мРНК, кодирующую конститутивно активный STING человека, вводят в состав одной и той же липидной наночастицы, как и каждую мРНК, кодирующую каждый KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией.

E73. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 68-72, в которой липидная наночастица имеет мольное соотношение около 20-60% ионизируемого аминолипида: 5-25% фосфолипида: 25-55% стерола; и содержит 0,5-15% ПЭГ-модифицированного липида.

E74. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 73, в которой ионизируемый аминолипид выбирают из группы, состоящей, например, из, 2,2-дилинолеил-4-

диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана (DLin-KC2-DMA), дилинолеил-метил-4-диметиламинобутирата (DLin-MC3-DMA), и ди((Z)-нон-2-ен-1-ил) 9-((4-(диметиламино)бутаноил)окси)гептадеканедиоата (L319).

E75. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 42-74, в которой каждая мРНК содержит по меньшей мере одну химическую модификацию.

E76. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 75, в которой химическую модификацию выбирают из группы, состоящей из псевдоуридина, N1-метилпсевдоуридина, 2-тиоуридина, 4'-тиоуридина, 5-метилцитозина, 2-тио-1-метил-1-дезазапсевдоуридина, 2-тио-1-метилпсевдоуридина, 2-тио-5-азауридина, 2-тиодигидропсевдоуридина, 2-тиодигидроуридина, 2-тиопсевдоуридина, 4-метокси-2-тиопсевдоуридина, 4-метоксипсевдоуридина, 4-тио-1-метилпсевдоуридина, 4-тиопсевдоуридина, 5-азауридина, дигидропсевдоуридина, 5-метилуридина, 5-метилуридина, 5-метоксиуридина, и 2'-O-метилуридина.

E77. Липидная наночастица, содержащая:

мРНК, имеющую открытую рамку считывания, кодирующую конкатемер из 4 KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией, причем 4 KRAS-пептида с активирующей онкогенной мутацией содержат G12D, G12V, G12C и G13D; и

мРНК, имеющую открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека.

E78. Липидная наночастица по варианту осуществления 77, в которой конкатемер содержит от N- к C-концу G12D, G12V, G13D и G12C.

E79. Липидная наночастица по варианту осуществления 77, в которой конкатемер содержит от N- к C-концу G12C, G13D, G12V и G12D.

E80. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 77-79, в которой KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 20, 21, 22, 23, 24, или 25 аминокислот.

E81. Липидная наночастица по варианту осуществления 80, в которой каждый KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 25 аминокислот.

E82. Липидная наночастица по варианту осуществления 77, в

которой конкатемер содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 137.

E83. Липидная наночастица по варианту осуществления 77, в которой мРНК, кодирующая конкатемер из 4 KRAS-пептида с активирующей онкогенной мутацией содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 138.

E84. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 77-83, в которой конститутивно активный полипептид STING человека содержит мутацию V155M.

E85. Липидная наночастица по варианту осуществления 84, в которой конститутивно активный полипептид STING человека содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1.

E86. Липидная наночастица по варианту осуществления 84, в которой мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит 3'-НТО, содержащую по меньшей мере один сайт связывания микроРНК miR-122.

E87. Липидная наночастица по варианту осуществления 84, в которой мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 139.

E88. Липидная наночастица, содержащая:

мРНК, имеющую открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12D;

мРНК, имеющую открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12V;

мРНК, имеющую открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12C;

мРНК, имеющую открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G13D; и

мРНК, имеющую открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека.

E89. Липидная наночастица по варианту осуществления 88, в которой KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислот.

E90. Липидная наночастица по варианту осуществления 89, в которой каждый KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 25 аминокислот.

E91. Липидная наночастица по варианту осуществления 88, в которой KRAS-пептиды с активирующей онкогенной мутацией содержат

аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 39-41 и 72.

E92. Липидная наночастица по варианту осуществления 88, в которой мРНК, кодирующие KRAS-пептиды с активирующей онкогенной мутацией, содержат нуклеотидные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 126-128 и 132.

E93. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 88-92, в которой конститутивно активный полипептид STING человека содержит мутацию V155M.

E94. Липидная наночастица по варианту осуществления 93, в которой конститутивно активный полипептид STING человека содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1.

E95. Липидная наночастица по варианту осуществления 94, в которой мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит 3'-НТО, содержащую по меньшей мере один сайт связывания микроРНК miR-122.

E96. Липидная наночастица по варианту осуществления 94, в которой мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 139.

E97. Липидная наночастица, содержащая:

мРНК, имеющую открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12D; и

мРНК, имеющую открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека.

E98. Липидная наночастица, содержащая:

мРНК, имеющую открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12V; и

мРНК, имеющую открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека.

E99. Липидная наночастица, содержащая:

мРНК, имеющую открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12C; и

мРНК, имеющую открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека.

E100. Липидная наночастица, содержащая:

мРНК, имеющую открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G13D; и

мРНК, имеющую открытую рамку считывания, кодирующую

конститутивно активный полипептид STING человека.

E101. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 97-100, в которой каждый KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 20, 21, 22, 23, 24, или 25 аминокислот.

E102. Липидная наночастица по варианту осуществления 101, в которой каждый KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 25 аминокислот.

E103. Липидная наночастица по варианту осуществления 97, в которой KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 39.

E104. Липидная наночастица по варианту осуществления 97, в которой мРНК, кодирующая KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержит нуклеотидные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 126.

E105. Липидная наночастица по варианту осуществления 98, в которой KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 40.

E106. Липидная наночастица по варианту осуществления 98, в которой мРНК, кодирующая KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержит нуклеотидные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 127.

E107. Липидная наночастица по варианту осуществления 99, в которой KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 72.

E108. Липидная наночастица по варианту осуществления 99, в которой мРНК, кодирующая KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержит нуклеотидные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 132.

E109. Липидная наночастица по варианту осуществления 100, в которой KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 41.

E110. Липидная наночастица по варианту осуществления 100, в которой мРНК, кодирующая KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержит нуклеотидные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 128.

E111. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 97-110, в которой конститутивно активный полипептид STING человека содержит мутацию V155M.

E112. Липидная наночастица по варианту осуществления 111, в

которой конститутивно активный полипептид STING человека содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1.

E113. Липидная наночастица по варианту осуществления 111, в которой мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит 3'-НТО, содержащую по меньшей мере один сайт связывания микроРНК miR-122.

E114. Липидная наночастица по варианту осуществления 111, в которой мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 139.

E115. Способ лечения субъекта, включающий:

введение субъекту, страдающему раком, иммуномодулирующей терапевтической композиции по любому из вариантов осуществления 1-76 или липидной наночастицы по любому из вариантов осуществления 77-114.

E116. Способ по варианту осуществления 115, в котором иммуномодулирующую терапевтическую композицию или липидную наночастицу вводят в комбинации с противораковым терапевтическим агентом.

E117. Способ по варианту осуществления 115 или 116, в котором иммуномодулирующую терапевтическую композицию или липидную наночастицу вводят в комбинации с полипептидом-ингибитором контрольной точки.

E118. Способ по варианту осуществления 117, в котором полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой антитело или его фрагмент, который специфически связывается с молекулой, выбранной из группы, состоящей из PD-1, PD-L1, TIM-3, VISTA, A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, IDO, KIR и LAG3.

E119. Способ по любому из вариантов осуществления 115-118, в котором рак выбирают из рака поджелудочной железы, брюшины, толстой кишки, тонкой кишки, желчных путей, легкого, эндометрия, яичника, половых путей, желудочно-кишечного тракта, шейки матки, желудка, мочевыводящих путей, ободочной кишки, прямой кишки и кроветворных и лимфоидных тканей.

E120. Способ по варианту осуществления 113, в котором рак представляет собой колоректальный рак.

E121. Липидная наночастица, содержащая:

первую мРНК, имеющую открытую рамку считывания, кодирующую конкатемер из 4 KRAS-пептидов с активирующей онкогенной

мутацией, причем 4 KRAS-пептида с активирующей онкогенной мутацией содержат G12D, G12V, G12C и G13D; и

вторую мРНК, имеющую открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека,

при этом первая мРНК и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING, выбранном из группы, состоящей из 1: 1, 2: 1, 3: 1, 4: 1, 5: 1, 6: 1, 7: 1, 8: 1, 9: 1 или 10: 1.

E122. Липидная наночастица по варианту осуществления 121, в которой конкатемер содержит от N- к C-концу G12D, G12V, G13D и G12C.

E123. Липидная наночастица по варианту осуществления 121, в которой конкатемер содержит от N- к C-концу G12C, G13D, G12V и G12D.

E124. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 121-123, в которой KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 20, 21, 22, 23, 24, или 25 аминокислот.

E125. Липидная наночастица по варианту осуществления 124, в которой каждый KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 25 аминокислот.

E126. Липидная наночастица по варианту осуществления 121, в которой конкатемер содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 137.

E127. Липидная наночастица по варианту осуществления 121, в которой мРНК, кодирующая конкатемер из 4 KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 138.

E128. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 121-127, в которой конститутивно активный полипептид STING человека содержит мутацию V155M.

E129. Липидная наночастица по варианту осуществления 128, в которой конститутивно активный полипептид STING человека содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1.

E130. Липидная наночастица по варианту осуществления 128, в которой мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит 3'-НТО, содержащую по меньшей мере один сайт связывания микроРНК miR-122.

E131. Липидная наночастица по варианту осуществления 128, в которой мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING

человека, содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 139.

E132. Липидная наночастица, содержащая:

первую мРНК, имеющую открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12D;

вторую мРНК, имеющую открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12V;

третью мРНК, имеющую открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12C;

четвертую мРНК, имеющую открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G13D; и

пятую мРНК, имеющую открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека,

при этом первая, вторая, третья, четвертая и пятая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING, выбранном из группы, состоящей из 1: 1, 2: 1, 3: 1, 4: 1, 5: 1, 6: 1, 7: 1, 8: 1, 9: 1 или 10: 1.

E133. Липидная наночастица по варианту осуществления 132, в которой каждый KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислот.

E134. Липидная наночастица по варианту осуществления 133, в которой каждый KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 25 аминокислот.

E135. Липидная наночастица по варианту осуществления 132, в которой KRAS-пептиды с активирующей онкогенной мутацией содержат аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 39-41 и 72.

E136. Липидная наночастица по варианту осуществления 132, в которой мРНК, кодирующие KRAS-пептиды с активирующей онкогенной мутацией, содержат нуклеотидные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 126-128 и 132.

E137. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 132-136, в которой конститутивно активный полипептид STING человека содержит мутацию V155M.

E138. Липидная наночастица по варианту осуществления 137, в которой конститутивно активный полипептид STING человека содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1.

E139. Липидная наночастица по варианту осуществления 138, в

которой мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит 3'-НТО, содержащую по меньшей мере один сайт связывания микроРНК miR-122.

E140. Липидная наночастица по варианту осуществления 137, в которой мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 139.

E141. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 121-131, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 1: 1.

E142. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 121-131, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 2: 1.

E143. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 121-131, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 3: 1.

E144. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 121-131, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 4: 1.

E145. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 121-131, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 5: 1.

E146. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 121-131, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 6: 1.

E147. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 121-131, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 7: 1.

E148. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 121-131, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 8: 1.

E149. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 121-140, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 9: 1.

E150. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 121-140, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 10: 1.

E151. Композиция, содержащая:

(i) первую мРНК, имеющую открытую рамку считывания, кодирующую конкатемер из 4 KRAS-пептидов с активирующей

онкогенной мутацией, причем конкатемер содержит от N- к C-концу G12D, G12V, G13D и G12C, и

(ii) вторую мРНК, имеющую открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека, при этом конститутивно активный полипептид STING человека содержит мутацию V155M,

причем первая мРНК и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING, выбранном из группы, состоящей из 1: 1, 2: 1, 3: 1, 4: 1, 5: 1, 6: 1, 7: 1, 8: 1, 9: 1 или 10: 1;

и фармацевтически приемлемый носитель.

E152. Композиция по варианту осуществления 151, в которой конкатемер из 4 KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 137.

E153. Композиция по варианту осуществления 151 или 152, в которой первая мРНК, кодирующая конкатемер из 4 KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 169.

E154. Композиция по любому из вариантов осуществления 151 - 153, в которой конститутивно активный полипептид STING человека содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1.

E155. Композиция по любому из вариантов осуществления 151-154, в которой мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 170.

E156. Композиция по любому из вариантов осуществления 151-155, в которой первая мРНК содержит 5'-НТО, содержащую нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 176.

E157. Композиция по любому из вариантов осуществления 151-155, в которой вторая мРНК содержит 5'-НТО, содержащую нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 176.

E158. Композиция по любому из вариантов осуществления 151-157, в которой вторая мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит 3'-НТО, имеющую сайт связывания микроРНК miR-122.

E159. Композиция по варианту осуществления 158, в которой сайт связывания микроРНК miR-122 содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 175.

E160. Композиция по любому из вариантов осуществления 151-

159, в которой каждая из первой мРНК и второй мРНК содержит поли(А)-хвост.

E161. Композиция по варианту осуществления 160, в которой поли(А)-хвост содержит около 100 нуклеотидов.

E162. Композиция по любому из вариантов осуществления 151-161, в которой каждая из первой и второй мРНК содержит структуру 5′-кэп 1.

E163. Композиция по любому из вариантов осуществления 151-162, в которой каждая из первой и второй мРНК содержит по меньшей мере одну химическую модификацию.

E164. Композиция по варианту осуществления 163, в которой химическая модификация представляет собой N1-метилпсевдоуридин.

E165. Композиция по варианту осуществления 164, в которой первая мРНК полностью модифицирована N1-метилпсевдоуридином.

E166. Композиция по варианту осуществления 164, в которой вторая мРНК полностью модифицирована N1-метилпсевдоуридином.

E167. Композиция по любому из вариантов осуществления 151-166, в которой фармацевтически приемлемый носитель содержит буферный раствор.

E168. Композиция, содержащая:

(i) первую мРНК, содержащую нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 167, и

(ii) вторую мРНК, содержащую нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 168,

причем каждая из первой и второй мРНК является полностью модифицированной N1-метилпсевдоуридином, и

причем первая мРНК и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING, выбранном из группы, состоящей из 1: 1, 2: 1, 3: 1, 4: 1, 5: 1, 6: 1, 7: 1, 8: 1, 9: 1 или 10: 1;

и фармацевтически приемлемый носитель.

E169. Композиция по варианту осуществления 168, в которой фармацевтически приемлемый носитель содержит буферный раствор.

E170. Композиция по любому из вариантов осуществления 151-169, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 1: 1.

E171. Композиция по любому из вариантов осуществления 151-169, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 2: 1.

E172. Композиция по любому из вариантов осуществления 151-169, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом

соотношении KRAS: STING 3: 1.

E173. Композиция по любому из вариантов осуществления 151-169, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 4: 1.

E174. Композиция по любому из вариантов осуществления 151-169, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 5: 1.

E175. Композиция по любому из вариантов осуществления 151-169, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 6: 1.

E176. Композиция по любому из вариантов осуществления 151-169, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 7: 1.

E177. Композиция по любому из вариантов осуществления 151-169, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 8: 1.

E178. Композиция по любому из вариантов осуществления 151-169, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 9: 1.

E179. Композиция по любому из вариантов осуществления 151-169, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 10: 1.

E180. Композиция по любому из вариантов осуществления 151-179, которую вводят в состав липидной наночастицы.

E181. Композиция по варианту осуществления 180, в которой липидная наночастица имеет мольное соотношение около 20-60% ионизируемого аминолипида: 5-25% фосфолипида: 25-55% стерола; и содержит 0,5-15% ПЭГ-модифицированного липида.

E182. Композиция по варианту осуществления 181, в которой липидная наночастица имеет мольное соотношение около 50% соединения 25: около 10% DSPC: около 38,5% холестерина; и содержит около 1,5% ПЭГ-DMG.

E183. Композиция по любому из вариантов осуществления 151-182, которую составляют для внутримышечной доставки.

E184. Липидная наночастица, содержащая:

(i) первую мРНК, имеющую открытую рамку считывания, кодирующую конкатемер из 4 KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией, причем конкатемер содержит от N- к C-концу G12D, G12V, G13D и G12C; и

(ii) вторую мРНК, имеющую открытую рамку считывания,

кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека, при этом конститутивно активный полипептид STING человека содержит мутацию V155M,

причем первая мРНК и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 5: 1.

E185. Липидная наночастица по варианту осуществления 184, в которой конкатемер из 4 KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 137.

E186. Липидная наночастица по варианту осуществления 184 или 185, в которой первая мРНК, кодирующая конкатемер из 4 KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 169.

E187. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 184 -186, в которой конститутивно активный полипептид STING человека содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1.

E188. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 184-187, в которой мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 170.

E189. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 184-188, в которой первая мРНК содержит 5'-НТО, содержащую нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 176.

E190. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 184-188, в которой вторая мРНК содержит 5'-НТО, содержащую нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 176.

E191. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 184-190, в которой вторая мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит 3'-НТО, имеющую сайт связывания микроРНК miR-122.

E192. Липидная наночастица по варианту осуществления 191, в которой сайт связывания микроРНК miR-122 содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 175.

E193. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 184-192, в которой каждая из первой и второй мРНК содержит поли(A)-хвост.

E194. Липидная наночастица по варианту осуществления 193, в

которой поли(А)-хвост содержит около 100 нуклеотидов.

E195. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 184-194, в которой каждая из первой и второй мРНК содержит структуру 5'-кэп 1.

E196. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 184-195, в которой каждая из первой и второй мРНК содержит по меньшей мере одну химическую модификацию.

E197. Липидная наночастица по варианту осуществления 196, в которой химическая модификация представляет собой N1-метилпсевдоуридин.

E198. Липидная наночастица по варианту осуществления 197, в которой первая мРНК полностью модифицирована N1-метилпсевдоуридином.

E199. Липидная наночастица по варианту осуществления 197, в которой вторая мРНК полностью модифицирована N1-метилпсевдоуридином.

E200. Липидная наночастица, содержащая:

(i) первую мРНК, содержащую нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 167; и

(ii) вторую мРНК, содержащую нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 168,

причем каждая из первой и второй мРНК является полностью модифицированной N1-метилпсевдоуридином, и

причем первая мРНК и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 5: 1.

E201. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 184-200, причем липидная наночастица имеет мольное соотношение около 20-60% ионизируемого аминолипида: 5-25% фосфолипида: 25-55% стерола; и содержит 0,5-15% ПЭГ-модифицированного липида.

E202. Липидная наночастица по варианту осуществления 201, причем липидная наночастица имеет мольное соотношение около 50% соединения 25: около 10% DSPC: около 38,5% холестерина; и содержит около 1,5% ПЭГ-DMG.

E203. Фармацевтическая композиция, содержащая липидную наночастицу по любому из вариантов осуществления 184-202 и фармацевтически приемлемый носитель.

E204. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 203, которую составляют для внутримышечной доставки.

E205. Липидная наночастица по любому из вариантов

осуществления 184-202 и необязательный фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 203-204 для применения в лечении или задержке прогрессирования рака у индивидуума, в которой лечение включает введение композиции в комбинации со второй композицией, при этом вторая композиция содержит полипептид-ингибитор контрольной точки и необязательный фармацевтически приемлемый носитель.

E206. Применение липидной наночастицы по любому из вариантов осуществления 184-202 и необязательного фармацевтически приемлемого носителя при изготовлении лекарственного средства для лечения или задержки прогрессирования рака у индивидуума, причем лекарственное средство содержит липидную наночастицу и необязательный фармацевтически приемлемый носитель и при этом лечение включает введение лекарственного средства в комбинации с композицией, содержащей полипептид-ингибитор контрольной точки и необязательный фармацевтически приемлемый носитель.

E207. Набор, содержащий контейнер, содержащий липидную наночастицу по любому из вариантов осуществления 184-202 и необязательный фармацевтически приемлемый носитель, или фармацевтическую композицию по любому из вариантов осуществления 203-204, и листок-вкладыш, содержащий инструкции по введению липидной наночастицы или фармацевтической композиции для лечения или задержки прогрессирования рака у индивидуума.

E208. Набор по варианту осуществления 207, в котором листок-вкладыш дополнительно содержит инструкции по введению липидной наночастицы или фармацевтической композиции в комбинации с композицией, содержащей полипептид-ингибитор контрольной точки и необязательный фармацевтически приемлемый носитель для лечения или задержки прогрессирования рака у индивидуума.

E209. Набор, содержащий лекарственное средство, содержащее липидную наночастицу по любому из вариантов осуществления 184-202 и необязательный фармацевтически приемлемый носитель, или фармацевтическую композицию по любому из варианту осуществлений 203-204, и листок-вкладыш, содержащий инструкции для введения только лекарственного средства или в комбинации с композицией, содержащей полипептид-ингибитор контрольной точки и необязательный фармацевтически приемлемый носитель для лечения

или задержки прогрессирования рака у индивидуума.

E210. Набор по варианту осуществления 209, в котором дополнительно содержит листок-вкладыш, содержащий инструкции по введению первого лекарственного средства до, во время или после введения второго лекарственного средства для лечения или задержки прогрессирования рака у индивидуума.

E211. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 184-202, композиция по любому из вариантов осуществления 203-204, применение по вариантам осуществления 205-206 или набор по любому из варинатов осуществления 207-210, в которых полипептид-ингибитор контрольной точки ингибирует PD1, PD-L1, CTLA4 или их комбинацию.

E212. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 184-202, композиция по вариантам осуществления 203-204, применение по варианту осуществления 205-206 или набор по любому из вариантов осуществления 207-210, в которых полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой антитело.

E213. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 184-202, композиция по вариантам осуществления 203-204, применение по варианту осуществления 205-206 или набор по любому из вариантов осуществления 207-210, в которых полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой антитело, выбранное из анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает CTLA4, анти-PD1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает PD1, анти-PD-L1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает PD-L1, и их комбинации.

E214. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 184-202, композиция по вариантам осуществления 203-204, применение по вариантам осуществления 205-206 или набор по любому из вариантов осуществления 207-210, в которых полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой анти-PD-L1 антитело, выбранное из атезолизумаба, авелумаба или дурвалумаба.

E215. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 184-202, композиция по вариантам осуществления 203-204, применение по вариантам осуществления 205-206 или набор по любому из вариантов осуществления 197-200, в которых

полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой анти-CTLA-4 антитело, выбранное из тремелимумаба или ипилимумаба.

E216. Липидная наночастица по любому из вариантов осуществления 184-202, композиция по вариантам осуществления 203-204, применение по вариантам осуществления 205-206 или набор по любому из вариантов осуществления 197-200, в которых полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой анти-PD1 антитело, выбранное из ниволумаба или пембролизумаба.

E217. Способ снижения или уменьшения размера опухоли или ингибирования роста опухоли у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту липидной наночастицы по любому из вариантов осуществления 184-202 или композиции по любому из вариантов осуществления 203-204.

E218. Способ индукции противоопухолевого ответа у субъекта, страдающего раком, включающий введение субъекту липидной наночастицы по любому из вариантов осуществления 184-202 или композиции по любому из вариантов осуществления 203-204.

E219. Способ по варианту осуществления 218, в котором противоопухолевый ответ включает Т-клеточный ответ.

E220. Способ по варианту осуществления 219, в котором Т-клеточный ответ включает CD8+ Т-клетки.

E221. Способ по любому из вариантов осуществления 217-220, в котором композицию вводят при помощи внутримышечной инъекции.

E222. Способ по любому из вариантов осуществления 217-220, дополнительно включающий введение второй композиции, содержащей полипептид- ингибитор контрольной точки и необязательный фармацевтически приемлемый носитель.

E223. Способ по варианту осуществления 222, в котором полипептид-ингибитор контрольной точки ингибирует PD1, PD-L1, CTLA4 или их комбинацию.

E224. Способ по варианту осуществления 223, в котором полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой антитело.

E225. Способ по варианту осуществления 224, в котором полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой антитело, выбранное из анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает CTLA4, анти-PD1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает PD1, анти-PD-L1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает

PD-L1, и их комбинацию.

E226. Способ по варианту осуществления 225, в котором полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой анти-PD-L1 антитело, выбранное из атезолизумаба, авелумаба или дурвалумаба.

E227. Способ по варианту осуществления 225, в котором полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой анти-CTLA-4 антитело, выбранное из тремелимумаба или ипилимумаба.

E228. Способ по варианту осуществления 225, в котором полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой анти-PD1 антитело, выбранное из ниволумаба или пембролизумаба.

E229. Способ по любому из вариантов осуществления 222-228, в котором композицию, содержащую полипептид-ингибитор контрольной точки, вводят при помощи внутривенной инъекции.

E230. Способ по варианту осуществления 229, в котором композицию, содержащую полипептид-ингибитор контрольной точки, вводят один раз каждые 2-3 недели.

E231. Способ по варианту осуществления 229, в котором композицию, содержащую полипептид-ингибитор контрольной точки, вводят один раз каждые 2 недели или один раз каждые 3 недели.

E232. Способ по любому из вариантов осуществления 222-231, в котором композицию, содержащую полипептид-ингибитор контрольной точки, вводят до, одновременно или после введения липидной наночастицы или ее фармацевтической композиции.

E233. Способ по любому из вариантов осуществления 217-232, в котором субъект имеет гистологически подтвержденную мутацию KRAS, выбранную из G12D, G12V, G13D или G12C.

E234. Способ по любому из вариантов осуществления 217-233, в котором опухоль представляет собой метастатический колоректальный рак.

E235. Способ по любому из вариантов осуществления 217-233, в котором опухоль представляет собой немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ).

E236. Способ по любому из вариантов осуществления 217-233, в котором опухоль представляет собой рак поджелудочной железы.

E237. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция, содержащая:

одну или более мРНК, каждая из которых имеет открытую рамку считывания, кодирующую пептид с активирующей онкогенной мутацией, и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

E238. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция согласно варианту осуществления 237, в которой активирующая онкогенная мутация представляет собой мутацию KRAS.

E239. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 238, в которой мутация KRAS представляет собой мутацию G12.

E240. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 239, в которой мутацию KRAS G12 выбирают из мутации KRAS G12D, G12V, G12S, G12C, G12A и G12R.

E241. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 239, в которой мутацию KRAS G12 выбирают из мутации KRAS G12D, G12V и G12S.

E242. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 238, в которой мутация KRAS представляет собой мутацию G13.

E243. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 242, в которой мутация KRAS G13 представляет собой мутацию KRAS G13D.

E244. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 237, в которой активирующая онкогенная мутация представляет собой мутацию H-RAS или N-RAS.

E245. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 237-244, в которой мРНК имеет открытую рамку считывания, кодирующую конкатемер из двух или более пептидов с активирующей онкогенной мутацией.

E246. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 245, в которой по меньшей мере два пептидных эпитопа отделены друг от друга одним глицином.

E247. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 245-246, в которой конкатемер содержит 3-10 пептидов с активирующей онкогенной мутацией.

E248. Пептиды с активирующей онкогенной мутацией по любому из вариантов осуществления 245-247, в которых все пептидные эпитопы отделены друг от друга одним глицином.

E249. Пептиды с активирующей онкогенной мутацией по любому из вариантов осуществления 245-247, в которых по меньшей мере два пептидных эпитопа связаны непосредственно друг с другом без линкера.

E250. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 237-249, в которой композиция

дополнительно содержит противораковый терапевтический агент.

E251. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 237-250, в которой композиция дополнительно содержит полипептид-ингибитор контрольной точки.

E252. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 251, в которой полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой антитело или его фрагмент, который специфически связывается с молекулой, выбранной из группы, состоящей из PD-1, TIM-3, VISTA, A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, IDO, KIR и LAG3.

E253. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 237-252, в которой композиция дополнительно содержит сенсибилизирующий антиген.

E254. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 253, в которой сенсибилизирующий антиген представляет собой антиген инфекционного заболевания.

E255. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 237-254, в которой композиция не содержит стабилизирующего агента.

E256. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 237-255, в которой мРНК вводят в состав липидной наночастицы-носителя.

E257. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 256, в которой липидная наночастица-носитель имеет мольное соотношение около 20-60% катионного липида: 5-25% некатионного липида: 25-55% стерола; и содержит 0,5-15% ПЭГ-модифицированного липида.

E258. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 257, в которой катионный липид выбирают из группы, состоящей, например, из, 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана (DLin-KC2-DMA), дилинолеил-метил-4-диметиламинобутирата (DLin-MC3-DMA), и ди((Z)-нон-2-ен-1-ил) 9-((4-(диметиламино)бутаноил)окси)гептадеканедиоата (L319).

E259. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 237-258, в которой мРНК содержит по меньшей мере одну химическую модификацию.

E260. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по варианту осуществления 259, в которой химическую модификацию выбирают из группы, состоящей из псевдоуридина, N1-

метилпсевдоуридина, 2-тиоуридина, 4'-тиоуридина, 5-метилцитозина, 2-тио-1-метил-1-дезазапсевдоуридина, 2-тио-1-метилпсевдоуридина, 2-тио-5-азауридина, 2-тиодигидропсевдоуридина, 2-тиодигидроуридина, 2-тиопсевдоуридина, 4-метокси-2-тиопсевдоуридина, 4-метоксипсевдоуридина, 4-тио-1-метилпсевдоуридина, 4-тиопсевдоуридина, 5-азауридина, дигидропсевдоуридина, 5-метилуридина, 5-метилуридина, 5-метоксиуридина, и 2'-О-метилуридина.

E261. Способ лечения субъекта, включающий: введение субъекту, страдающему раком, иммуномодулирующей терапевтической композиции по любому из вариантов осуществления 237-260.

E262. Способ по варианту осуществления 261, в котором иммуномодулирующую терапевтическую композицию

вводят в комбинации с противораковым терапевтическим агентом.

E263. Способ по варианту осуществления 261 или 260, в котором иммуномодулирующую терапевтическую композицию вводят в комбинации с полипептидом-ингибитором контрольной точки.

E264. Способ по варианту осуществления 263, в котором полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой антитело или его фрагмент, который специфически связывается с молекулой, выбранной из группы, состоящей из PD-1, TIM-3, VISTA, A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, IDO, KIR и LAG3.

E265. Способ по любому из вариантов осуществления 261-264, в котором рак выбирают из рака поджелудочной железы, брюшины, толстой кишки, тонкой кишки, желчных путей, легкого, эндометрия, яичника, половых путей, желудочно-кишечного тракта, шейки матки, желудка, мочевыводящих путей, ободочной кишки, прямой кишки и кроветворных и лимфоидных тканей.

E266. Способ по варианту осуществления 265, в котором рак представляет собой колоректальный рак.

**Определения**

*Введение:* Используемый в данном документе термин «введение» относится к способу доставки композиции субъекту или пациенту. Способ введения может быть выбран для целевой доставки (например, для конкретной доставки) в конкретную область или систему организма. Например, введение может быть парентеральным (например, подкожной, внутрикожной, внутривенной, внутрибрюшинной, внутримышечной, внутрисуставной,

внутриартериальной, интрасиновиальной, интрастернальной, интратекальной, внутриочаговой или внутричерепной инъекции а также с помощью любой подходящей методики инфузии), пероральным, транс- или интрадермальным, интердермальным, ректальным, интравагинальным, местным (например, с помощью порошков, мазей, кремов, гелей, лосьонов и/или капель), мукозальным, назальным, буккальным, энтеральным, витреальным, внутриопухолевым, сублингвальным, интраназальным; путем интратрахеальной инстилляции, бронхиальной инстилляции и/или ингаляции; в виде орального спрея и/или порошка, назального спрея и/или аэрозоля, и/или через катетер для воротной вены.

*Приблизительно, около:* Как используется в данном документе термины «приблизительно» или «около» применительно к одному или более значениям, представляющим интерес, относятся к значению, которое аналогично установленному эталонному значению. В некоторых вариантах осуществления термин «приблизительно» или «около» относится к диапазону значений, которые попадают в пределы 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или менее в любую сторону (больше или меньше) от установленного эталонного значения, если не указано иное или иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число превышало бы 100% от возможного значения).

*Рак:* Используемый в данном документе термин «рак» представляет собой патологическое состояние, включающее аномальный и/или нерегулируемый рост клеток. Термин рак охватывает доброкачественные и злокачественные опухоли. Типичные неограничивающие виды рака включают рак коры надпочечников, распространенный рак, рак анального канала, апластическую анемию, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, рак костей, костный метастаз, опухоли головного мозга, рак мозга, рак молочной железы, детский рак, рак неизвестной первичной локализации, болезнь Каслмана, рак шейки матки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак пищевода, семейство опухолей Юинга, рак глаз, рак желчного пузыря, желудочно-кишечные карциноидные опухоли, желудочно-кишечные стромальные опухоли, гестационную трофобластическую опухоль, болезнь Ходжкина, саркому Капоши, почечно-клеточную карциному, рак гортани и гортаноглотки, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический лимфолейкоз, хронический миелолейкоз, хронический

миеломоноцитарный лейкоз, миелодиспластический синдром (включая рефрактерные анемии и рефрактерные цитопении), миелопролиферативные новообразования или заболевания (включая истинную полицитемию, эссенциальный тромбоцитоз и первичный миелофиброз), рак печени (например, гепатоцеллюлярную карциному), немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, карциноидную опухоль легкого, лимфому кожи, злокачественную мезотелиому, множественную миелому, миелодиспластический синдром, рак полости носа и околоносовых пазух, рак носоглотки, нейробластому, неходжкинскую лимфому, рак полости рта и ротоглотки, остеосаркому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак полового члена, опухоли гипофиза, рак предстательной железы, ретинобластому, рабдомиосаркому, рак слюнных желез, саркому мягких тканях у взрослых, базальноклеточный и плоскоклеточный рак кожи, меланому, рак тонкой кишки, рак желудка, рак яичек, рак горла, рак тимуса, рак щитовидной железы, саркому матки, рак влагалища, рак вульвы, макроглобулинемию Вальденстрема, опухоль Вильмса и вторичные онкологические заболевания, вызванные противоопухолевой терапией. В конкретных вариантах осуществления рак представляет собой рак печени (например, гепатоцеллюлярную карциному) или колоректальный рак. В других вариантах осуществления рак представляет собой рак крови или гематопоэтический рак.

*Расщепляемый линкер:* Используемый в данном документе термин «расщепляемый линкер» относится к линкеру, как правило, пептидному линкеру (например, длиной около 5-30 аминокислот, как правило, длиной около 10-20 аминокислот), который может быть включен в полицистронные конструкты мРНК, такие как что эквимолярные уровни нескольких генов могут быть получены из одной и той же мРНК. Неограничивающие примеры расщепляемых линкеров включают семейство пептидов 2A, включая F2A, P2A, T2A и E2A, впервые обнаруженные в пикорнавирусе, которые при включении в конструкт мРНК (например, между двумя полипептидными доменами) функционируют, заставляя рибосому пропускать синтез пептидной связи на С-конце элемента 2A, что приводит к разделению между концом последовательности 2A и следующим по ходу транскрипции пептидом.

*Конъюгированные:* Используемый в данном документе термин «конъюгированный» при использовании в отношении двух или более фрагментов означает, что фрагменты физически соединены или

связаны друг с другом, или напрямую, или через один или более дополнительных фрагментов, которые служат связующим агентом, с образованием структуры, которая является достаточно стабильной, так что фрагменты остаются физически связанными в условиях, в которых используется структура, например, в физиологических условиях. В некоторых вариантах осуществления два или более фрагментов могут быть конъюгированы посредством прямого образования ковалентной химической связи. В других вариантах осуществления два или более фрагментов могут быть конъюгированы посредством образования ионной связи или водородной связи.

*Приведение в контакт:* Используемый в данном документе термин «приведение в контакт» означает установление физической связи между двумя или более объектами. Например, приведение в контакт клетки с мРНК или композицией липидной наночастицы означает, что клетка и мРНК или липидная наночастица достигают взаимодействия при физическом контакте. Способы приведения в контакт клеток с внешними объектами как *in vivo*, *in vitro*, так и *ex vivo* хорошо известны в области биологии. В иллюстративных вариантах осуществления раскрытия стадию приведения в контакт клетки млекопитающего с композицией (например, выделенной мРНК, наночастицей или фармацевтической композицией согласно раскрытию) выполняют in vivo. Например, приведение в контакт композиции липидных наночастиц и клетки (например, клетки млекопитающего), которая может находиться в организме (например, млекопитающем), может осуществляться любым подходящим путем введения (например, парентеральным введением в организм, включая внутривенное, внутримышечное, внутрикожное и подкожное введение). Для клетки, присутствующей in vitro, композиция (например, липидная наночастица или выделенная мРНК) и клетка могут контактировать, например, путем добавления композиции к культуральной среде клетки и могут включать или приводить к трансфекции. Кроме того, более чем одна клетка может контактировать с композицией наночастиц.

*Инкапсулировать:* Используемый в данном документе термин «инкапсулировать» означает заключать, окружать или заключать в оболочку. В некоторых вариантах осуществления соединение, полинуклеотид (например, мРНК) или другая композиция могут быть полностью инкапсулированы, частично инкапсулированы или по существу инкапсулированы. Например, в некоторых вариантах осуществления мРНК согласно раскрытию может быть инкапсулирована

в липидную наночастицу, например, липосому.

*Эффективное количество:* Используемый в данном документе термин «эффективное количество» агента представляет собой такое количество, которое достаточно для достижения полезных или желаемых результатов, например, клинических результатов, и, как таковое, «эффективное количество» зависит от контекста, в котором оно применяется. Например, в контексте введения агента, который лечит рак, эффективное количество агента представляет собой, например, количество, достаточное для достижения лечения, как определено в данном документе, рака по сравнению с ответом, полученным без введения агента. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество представляет собой количество доставляемого агента (например, нуклеиновой кислоты, лекарственного средства, терапевтического агента, диагностического агента или профилактического агента), которое является достаточным при введении субъекту, страдающему или подверженному инфекции, заболеванию, расстройству и/или патологическому состоянию, для лечения, улучшения симптомов, диагностики, предотвращения и/или задержки начала инфекции, заболевания, расстройства и/или патологического состояния.

*Экспрессия:* Используемый в данном документе термин «экспрессия» последовательности нуклеиновой кислоты относится к одному или более из следующих событий: (1) продукции матрицы РНК из последовательности ДНК (например, путем транскрипции); (2) процессинга РНК-транскрипта (например, путем сплайсинга, редактирования, образования 5'-кэп-структуры и/или процессинга 3'-конца); (3) трансляции РНК в полипептид или белок; и (4) посттрансляционной модификации полипептида или белка.

*Идентичность:* Используемый в данном документе термин «идентичность» относится к общему сходству между полимерными молекулами, например, между полинуклеотидными молекулами (например, молекулами ДНК и/или молекулами РНК) и/или между полипептидными молекулами. Например, вычисление процентной идентичности двух полинуклеотидных последовательностей может быть выполнено путем выравнивания двух последовательностей с целью оптимального сравнения (например, гэпы могут быть введены в одну или обе из первой и второй последовательностей нуклеиновых кислот для оптимального выравнивания и неидентичные последовательности могут игнорироваться с целью сравнения). В некоторых вариантах осуществления длина последовательности,

выровненной для целей сравнения, составляет по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% длины эталонной последовательности. Затем сравнивают нуклеотиды в соответствующих положениях нуклеотидов. Когда положение в первой последовательности занято тем же нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы в этом положении идентичны. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией от числа совпадающих положений в последовательностях с учетом числа гэпов и длины каждого гэпа, которые необходимо вносить для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно осуществлять с помощью математического алгоритма. Например, процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями может быть определен с использованием способов, таких как описанные в *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; *Computer Analysis of Sequence Data*, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; и *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки. Например, процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями может быть определен с использованием алгоритма Meyers и Miller (CABIOS, 1989, 4:11-17), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), с использованием таблицы весов замен остатков PAM120, штрафа за продолжение гэпа 12 и штрафа за открытие гэпа 4. Процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями, в качестве альтернативы, может быть определен с использованием программы GAP из пакета программного обеспечения GCG с использованием матрицы NWSgapdna.CMP. Способы, обычно используемые для определения процента идентичности между последовательностями, включают, но не ограничиваются теми, которые описаны в Carillo, H., and Lipman, D., *SIAM J Applied Math.*, 48:1073 (1988); включенной в данный документ посредством ссылки. Методики определения

идентичности запрограммированы в общедоступных компьютерных программах. Иллюстративное компьютерное программное обеспечение для определения гомологии между двумя последовательностями включает, но не ограничивается этим, пакет программ GCG, Devereux et al., *Nucleic Acids Research*, 12(1): 387,1984, BLASTP, BLASTN, и FASTA, Altschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.*, 215, 403, 1990.

*Фрагмент:* «Фрагмент», как используется в данном документе, относится к части. Например, фрагменты белков могут включать полипептиды, полученные перевариванием полноразмерного белка, выделенного из культивируемых клеток, или полученные методами рекомбинантной ДНК.

*GC-богатый*: Используемый в данном документе термин «GC-богатый» относится к композиции нуклеотидных оснований полинуклеотида (например, мРНК) или любой его части (например, элемента РНК), содержащей нуклеотидные основания гуанина (G) и/или цитозина (C), или их производные или аналоги, при этом содержание GC составляет более около 50%. Термин «GC-богатый» относится ко всему или к части полинуклеотида, включая, но не ограничиваясь этим, ген, некодирующую область, 5'-НТО, 3'-НТО, открытую рамку считывания, элемент РНК, мотив последовательности или любую отдельную последовательность, фрагмент или сегмент, который содержит около 50% долю GC. В некоторых вариантах осуществления изобретения GC-богатые полинуклеотиды или любые их части состоят исключительно из нуклеотидных оснований гуанина (G) и/или цитозина (C).

Содержание GC: Используемый в данном документе термин «содержание GC» относится к процентному содержанию нуклеотидных оснований в полинуклеотиде (например, мРНК) или его части (например, элемент РНК), которые представляют собой нуклеотидные основания, гуанин (G) и цитозин (C), или их производные или аналоги (из общего числа возможных нуклеотидных оснований, включая аденин (A) и тимин (T) или урацил (U) и их производные или аналоги в ДНК и в РНК). Термин «содержание GC» относится ко всему или к части полинуклеотида, включая, но не ограничиваясь этим, ген, некодирующую область, 5'- или 3'-НТО, открытую рамку считывания, элемент РНК, мотив последовательности или любую отдельную последовательность, фрагмент или сегмент.

*Генетический адъювант:* «Генетический адъювант», как используется в данном документе, относится к конструкту мРНК

(например, конструкту ммРНК), который усиливает иммунный ответ на вакцину, например, посредством стимуляции продукции цитокинов и/или путем стимуляции продукции антигенспецифических эффекторных клеток (например, CD8 Т-клеток). Генетический адъювантный конструкт мРНК может, например, кодировать полипептид, который стимулирует интерферон типа I (например, активирует сигналинг интерферона типа I) или который способствует развитию или активности дендритных клеток.

*Гетерологичный:* Используемый в данном документе термин «гетерологичный» означает, что последовательность (например, аминокислотная последовательность или полинуклеотид, который кодирует аминокислотную последовательность) обычно не присутствует в данном полипептиде или полинуклеотиде. Например, аминокислотная последовательность, которая соответствует домену или мотиву одного белка, может быть гетерологичной по отношению ко второму белку.

*Гидрофобная аминокислота:* «Гидрофобная аминокислота», как используется в данном документе, представляет собой аминокислоту, имеющую незаряженную неполярную боковую цепь. Примерами природных гидрофобных аминокислот являются аланин (Ala), валин (Val), лейцин (Leu), изолейцин (Ile), пролин (Pro), фенилаланин (Phe), метионин (Met) и триптофан (Trp).

Иммуностимулятор: Используемый в данном документе термин «иммуностимулятор» относится к конструкту мРНК (например, конструкту ммРНК), который усиливает иммунный ответ, например, на представляющий интерес антиген (или на эндогенный антиген у субъекта, которому вводят иммуностимулятор, или на экзогенный антиген, который вводится совместно с иммуностимулятором), например, посредством стимуляции ответов Т-клеток, В-клеток или дендритных клеток, включая, но не ограничиваясь этим, продукцию цитокинов, стимуляцию продукции антител или стимуляцию продукции антигенспецифических иммунных клеток (например, $CD8^+$ Т-клеток или $CD4^+$ Т-клеток).

Инициирующий кодон: Используемый в данном документе термин «инициирующий кодон», используемый взаимозаменяемо с термином «стартовый кодон», относится к первому кодону открытой рамки считывания, который транслируется рибосомой и состоит из триплета связанных нуклеотидных оснований аденина-урацила-гуанина. Инициирующий кодон обозначается первыми буквенными кодами аденина (A), урацила (U) и гуанина (G) и часто пишется

просто как «AUG». Хотя природные мРНК могут использовать кодоны, отличные от AUG, в качестве инициирующего кодона, которые упоминаются в данном документе как «альтернативные инициирующие кодоны», инициирующие кодоны полинуклеотидов, описанные в данном документе, используют кодон AUG. В процессе инициации трансляции последовательность, содержащая инициирующий кодон, распознается путем комплементарного спаривания оснований с антикодоном инициаторной тРНК (Met-tRNA$_i^{Met}$), связанной рибосомой. Открытые рамки считывания могут содержать более одного инициирующего кодона AUG, которые упоминаются в данном документе как «альтернативные инициирующие кодоны».

Инициирующий кодон играет критическую роль в инициации трансляции. Инициирующий кодон является первым кодоном открытой рамки считывания, которая транслируется рибосомой. Как правило, инициирующий кодон содержит нуклеотидный триплет AUG, однако в некоторых случаях инициация трансляции может происходить в других кодонах, состоящих из отдельных нуклеотидов. Инициация трансляции у эукариот представляет собой многоэтапный биохимический процесс, который включает многочисленные взаимодействия белок–белок, белок–РНК и РНК–РНК между молекулами матричными РНК (мРНК), 40S рибосомальной субъединицей, другими компонентами механизма трансляции (например, эукариотическими факторами инициации; eIF). Современная модель инициации трансляции мРНК постулирует, что преинициирующий комплекс (альтернативно «43S преинициирующий комплекс»; сокращенно «PIC») транслоцируется из сайта рекрутирования на мРНК (обычно 5'-кэп) в инициирующий кодон сканируя нуклеотиды в направлении от 5′ до 3', пока не встретится первый кодон AUG, который находится в специфическом нуклеотидном контексте, вызывающем трансляцию (последовательность Козак) (Kozak (1989) J Cell Biol 108:229-241). Сканирование с помощью PIC заканчивается комплементарным спариванием оснований между нуклеотидами, содержащими антикодон инициаторной транспортной РНК Met-tRNA$_i^{Met}$ и нуклеотидами, содержащими инициирующий кодон мРНК. Продуктивное спаривание оснований между кодоном AUG и антикодоном Met-tRNA$_i^{Met}$ вызывает серию структурных и биохимических событий, которые завершаются присоединением большой 60S рибосомной субъединицы к PIC с образованием активной рибосомы, которая способна к удлинению трансляции.

*Вставка:* Используемый в данном документе термин «вставка»

или «добавление» относится к изменению аминокислотной или нуклеотидной последовательности, приводящему к добавлению одного или более аминокислотных остатков или нуклеотидов, соответственно, к молекуле по сравнению с эталонной последовательностью, например, последовательностью, обнаруженной в природной молекуле. В некоторых вариантах осуществления вставка может быть заменой.

*Сайт вставки:* Используемый в данном документе термин «сайт вставки» представляет собой положение или область каркасного полипептида, которая поддается вставке аминокислотной последовательности гетерологичного полипептида. Следует понимать, что сайт вставки также может относиться к положению или области полинуклеотида, которая кодирует полипептид (например, кодон полинуклеотида, который кодирует данную аминокислоту в каркасном полипептиде). В некоторых вариантах осуществления вставка аминокислотной последовательности гетерологичного полипептида в каркасный полипептид практически не влияет на стабильность (например, конформационную стабильность), уровень экспрессии или общую вторичную структуру каркасного полипептида.

Выделенное: Используемый в данном документе термин «выделенное» относится к веществу или объекту, которые были отделены по меньшей мере от некоторых компонентов, с которыми оно было связано (будь то в природе или в экспериментальных условиях). Выделенные вещества могут иметь различную степень чистоты по отношению к веществам, с которыми они связаны. Выделенные вещества и/или объекты могут быть отделены по меньшей мере от около 10%, около 20%, около 30%, около 40%, около 50%, около 60%, около 70%, около 80%, около 90% или более из других компонентов, с которыми они были изначально связаны. В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенные агенты составляют более около 80%, около 85%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или более около 99% чистоты. Как используется в данном документе, вещество является «чистым», если оно по существу не содержит других компонентов.

*Последовательность Козак:* Термин «последовательность Козак» (также называемая «консенсусной последовательностью Козак») относится к элементу, усиливающему инициацию трансляции, который усиливает экспрессию гена или открытой рамки считывания, и

который у эукариот находится в 5’-НТО. Консенсусная последовательность Козак первоначально была определена как последовательность GCCRCC, где R=пурин, после анализа влияния отдельных мутаций, окружающих инициирующий кодон (AUG), на трансляцию гена препроинсулина (Kozak (1986) Cell 44:283-292). Полинуклеотиды, раскрытые в данном документе, содержат консенсусную последовательность Козак или ее производное или модификацию. (Примеры композиций энхансера трансляции и способы их применения см. в патенте США № 5807707 (Andrews et al.), включенного в данный документ во всей полноте посредством ссылки; патенте США № 5723332 (Chernajovsky), включенного в данный документ во всей полноте посредством ссылки; патенте США № № 5891665 (Wilson), включенном в данный документ в полном объеме посредством ссылки).

*Ослабленное сканирование:* Может возникнуть явление, известное как «ослабленное сканирование», когда PIC обходит инициирующий кодон и вместо этого продолжает сканирование по ходу транскрипции, пока не будет распознан другой или альтернативный инициирующий кодон. В зависимости от частоты появления, обход инициирующего кодона комплексом PIC может привести к снижению эффективности трансляции. Кроме того, может происходить трансляция из этого кодона AUG, расположенного далее по ходу транскрипции, что приведет к получению нежелательного, аберрантного продукта трансляции, который может быть неспособен вызвать желаемый терапевтический ответ. В некоторых случаях аберрантный продукт трансляции может фактически вызвать вредный ответ (Kracht et al., (2017) Nat Med 23(4):501-507).

*Липосома:* Используемый в данном документе термин «липосома» означает структуру, содержащую липидсодержащую мембрану, окружающую внутреннюю часть воды. Липосомы могут иметь одну или более липидных мембран. Липосомы включают однослойные липосомы (также известные в данной области техники как однослойные липосомы) и многослойные липосомы (также известные в данной области техники как многослойные липосомы).

Метастазирование: Используемый в данном документе термин «метастазирование» означает процесс, посредством которого рак распространяется от места, в котором он впервые возник в виде первичной опухоли, до отдаленных мест в организме. Вторичная опухоль, возникшая в результате этого процесса, может быть названа «метастазом».

*Модифицированный:* Используемый в данном документе термин «модифицированный» или «модификация» относится к измененному состоянию или изменению состава или структуры полинуклеотида (например, мРНК). Полинуклеотиды могут быть модифицированы различными способами, в том числе химически, структурно и/или функционально. Например, полинуклеотиды могут быть структурно модифицированы путем включения одного или более элементов РНК, причем элемент РНК содержит последовательность и/или вторичную структуру (структуры) РНК, которая обеспечивает одну или более функций (например, трансляционную регуляторную активность). Соответственно, полинуклеотиды согласно раскрытию могут содержать одну или более модификаций (например, могут включать одну или более химических, структурных или функциональных модификаций, включая любую их комбинацию).

*мРНК*: Используемый в данном документе термин «мРНК» относится к матричной рибонуклеиновой кислоте. мРНК может быть природной или не встречающейся в природе. Например, мРНК может содержать модифицированные и/или не встречающиеся в природе компоненты, такие как одно или более нуклеотидных оснований, нуклеозидов, нуклеотидов или линкеров. мРНК может содержать кэп-структуру, терминирующий нуклеозид, шпильку, поли(А)-последовательность и/или сигнал полиаденилирования. мРНК может иметь нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид. Трансляция мРНК, например, трансляция мРНК in vivo внутри клетки млекопитающего, может продуцировать полипептид. Традиционно базовые компоненты молекулы мРНК включают по меньшей мере кодирующую область, 5'-нетранслируемую область (5'-НТО), 3'-НТО, 5'-кэп и поли(А)-последовательность.

*микроРНК (миРНК):* Используемый в данном документе термин «микроРНК (миРНК)» представляет собой малую некодирующую молекулу РНК, которая может функционировать в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов (например, путем сайленсинга РНК, например, при помощи расщепления мРНК, дестабилизации мРНК путем укорочения его поли(А)-хвоста и/или интерференции с эффективностью трансляции мРНК в полипептид с помощью рибосомы). Длина зрелой миРНК обычно составляет около 22 нуклеотидов.

*микроРНК-122 (miR-122):* Используемый в данном документе термин «микроРНК-122 (miR-122)» относится к любой нативной miR-122 из любого позвоночного животного, включая, например, людей,

если не указано иное. miR-122 обычно экспрессируется на высоком уровне в печени, где она может регулировать метаболизм жирных кислот. Уровни miR-122 снижаются при раке печени, например, гепатоцеллюлярной карциноме. miR-122 является одной из наиболее высокоэкспрессируемых миРНК в печени, где она регулирует мишени, включая, но не ограничиваясь, CAT-1, CD320, AldoA, Hjv, Hfe, ADAM10, IGFR1, CCNG1, и ADAM17. Зрелая человеческая miR-122 может иметь последовательность AACGCCAUUAUCACACUAAAUA (SEQ ID NO: 172, соответствует hsa-miR-122-3p) или UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG (SEQ ID NO: 174, что соответствует hsa-miR-122-5p).

*микроРНК-21 (miR-21):* Используемый в данном документе термин «микроРНК-21 (miR-21)» относится к любой нативной miR-21 из любого позвоночного животного, включая, например, людей, если не указано иное. Уровни miR-21 повышаются при раке печени, например, гепатоцеллюлярной карциноме, по сравнению с нормальной печенью. Зрелая человеческая miR-21 может иметь последовательность UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA (SEQ ID NO: 34, что соответствует has-miR-21-5p) или 5′ - CAACACCAGUCGAUGGGCUGU - 3′ (SEQ ID NO: 35, что соответствует has-miR-21-3p).

*микроРНК-142 (miR-142):* Используемый в данном документе термин «микроРНК-142 (miR-142)» относится к любой нативной miR-142 из любого позвоночного животного, включая, например, людей, если не указано иное. miR-142 обычно экспрессируется на высоком уровне в миелоидных клетках. Зрелая человеческая miR-142 может иметь последовательность UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA (SEQ ID NO: 28, что соответствует hsa-miR-142-3p) или cauaaaguagaaagcacuacu (SEQ ID NO: 30, что соответствует hsa-miR-142-5p).

*Сайт связывания микроРНК (миРНК):* Используемый в данном документе термин «сайт связывания микроРНК (миРНК)» относится к сайту-мишени миРНК, сайту распознавания миРНК или любой нуклеотидной последовательности, с которой миРНК связывается или ассоциирует. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания миРНК представляет собой нуклеотидную область или область полинуклеотида (например, мРНК), с которой связывается по меньшей мере «затравочная» область миРНК. Следует понимать, что «связывание» может следовать традиционным правилам гибридизации Уотсона-Крика или может отражать любую стабильную ассоциацию миРНК с целевой последовательностью в или рядом с сайтом микроРНК.

*Затравочная область миРНК:* Используемый в данном документе термин «затравочная» область миРНК относится к последовательности в области положений 2–8 зрелой миРНК, которая обычно обладает идеальной комплементарностью Уотсона–Крика относительно сайта связывания миРНК. Затравочная область миРНК может охватывать положения 2–8 или 2–7 зрелой миРНК. В некоторых вариантах осуществления затравочная область миРНК может содержать 7 нуклеотидов (например, нуклеотиды 2–8 зрелой миРНК), где комплементарный сайт семян в соответствующем сайте связывания миРНК фланкирован аденином (A), противоположным положению 1 миРНК. В некоторых вариантах осуществления затравочная область миРНК может содержать 6 нуклеотидов (например, нуклеотиды 2–7 зрелой миРНК), где комплементарный сайт семян в соответствующем сайте связывания миРНК фланкирован аденином (A), противоположным положению 1 миРНК. При ссылке на сайт связывания миРНК затравочную последовательность миРНК следует понимать как имеющую комплементарность (например, частичную, существенную или полную комплементарность) с затравочной последовательностью миРНК, которая связывается с сайтом связывания миРНК.

*Модифицированный:* Используемый в данном документе термин «модифицированный» относится к измененному состоянию или структуре молекулы согласно раскрытию. Молекулы могут быть изменены многими способами, в том числе химически, структурно и функционально. В одном варианте осуществления молекулы мРНК согласно данному раскрытию модифицированы введением неприродных нуклеозидов и/или нуклеотидов, например, поскольку они относятся к природным рибонуклеотидам A, U, G и C. Неканонические нуклеотиды, такие как кэп-структуры, не считаются «модифицированными», хотя они отличаются от химической структуры рибонуклеотидов A, C, G, U.

*Наночастица:* Используемый в данном документе термин «наночастица» относится к частице, имеющей какую-либо одну структурную особенность в масштабе менее около 1000 нм, которая проявляет новые свойства по сравнению с объемным образцом из того же материала. Обычно наночастицы имеют любую структурную особенность в масштабе менее чем около 500 нм, менее чем около 200 нм или около 100 нм. Также обычно наночастицы имеют любую одну структурную особенность в масштабе от около 50 нм до около 500 нм, от около 50 нм до около 200 нм или от около 70 до около

120 нм. В иллюстративных вариантах осуществления наночастица представляет собой частицу, имеющую один или более размеров порядка около 1-1000 нм. В других иллюстративных вариантах осуществления наночастица представляет собой частицу, имеющую один или более размеров порядка около 10-500 нм. В других иллюстративных вариантах осуществления наночастица представляет собой частицу, имеющую один или более размеров порядка около 50-200 нм. Сферическая наночастица имела бы диаметр, например, около 50-100 или 70-120 нанометров. Наночастица чаще всего ведет себя как единое целое с точки зрения ее транспорта и свойств. Отмечено, что новые свойства, которые отличают наночастицы от соответствующего объемного материала, обычно проявляются в размере менее 1000 нм или в размере около 100 нм, но наночастицы могут иметь больший размер, например, для частиц, которые являются продолговатыми, трубчатыми и тому подобное. Хотя размер большинства молекул вписывается в вышеприведенную схему, отдельные молекулы обычно не называют наночастицами.

*Нуклеиновая кислота:* Используемый в данном документе термин «нуклеиновая кислота» используется в самом широком смысле и охватывает любое соединение и/или вещество, которое включает полимер нуклеотидов. Эти полимеры часто называют полинуклеотидами. Иллюстративные нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды согласно раскрытию включают, но не ограничиваются ими, рибонуклеиновые кислоты (РНК), дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК), гибриды ДНК-РНК, РНКи-индуцирующие агенты, агенты РНКи, киРНК, кшРНК, миРНК, антисмысловые РНК, рибозимы, каталитическую ДНК, РНК, которые индуцируют образование тройной спирали, треозо-нуклеиновые кислоты (ТНК), гликоль-нуклеиновые кислоты (ГНК), пептидо-нуклеиновые кислоты (ПНК), закрытые нуклеиновые кислоты (ЗНК, включая ЗНК, имеющую β-D-рибо-конфигурацию, α-ЗНК, имеющую α-L-рибо-конфигурацию (диастереомер ЗНК), 2'-амино-ЗНК, имеющую 2'-аминофункционализацию, и 2'-амино-α-ЗНК, имеющую 2'-аминофункционализацию), или их гибриды.

*Структура нуклеиновой кислоты:* Используемый в данном документе термин «структура нуклеиновой кислоты» (используемый взаимозаменяемо с «полинуклеотидной структурой») относится к расположению или организации атомов, химических компонентов, элементов, мотивов и/или последовательности связанных нуклеотидов или их производных или аналогов, которые содержат нуклеиновую кислоту (например, мРНК). Термин также относится к

двумерному или трехмерному состоянию нуклеиновой кислоты. Соответственно, термин «структура РНК» относится к расположению или организации атомов, химических компонентов, элементов, мотивов и/или последовательности связанных нуклеотидов или их производных или аналогов, содержащих молекулу РНК (например, мРНК) и/или относится к двумерному и/или трехмерному состоянию молекулы РНК. Структура нуклеиновой кислоты может быть дополнительно разделена на четыре организационные категории, упоминаемые в данном документе как «молекулярная структура», «первичная структура», «вторичная структура» и «третичная структура», в зависимости от возрастающей организационной сложности.

*Нуклеотидное основание:* Используемый в данном документе термин «нуклеотидное основание» (альтернативно «нуклеотидное основание» или «азотистое основание») относится к гетероциклическому соединению пурина или пиримидина, обнаруженному в нуклеиновых кислотах, включая любые производные или аналоги природных пуринов и пиримидинов, которые придают улучшенные свойства (например, аффинность связывания, резистентность к нуклеазе, химическую стабильность) нуклеиновой кислоте или ее части или сегмента. Аденин, цитозин, гуанин, тимин и урацил являются нуклеотидными основаниями, преимущественно встречающимися в природных нуклеиновых кислотах. Другие природные, неприродные и/или синтетические нуклеотидные основания, известные в данной области техники и/или описанные в данном документе, могут быть включены в нуклеиновые кислоты.

*Нуклеозид/нуклеотид:* Используемый в данном документе термин «нуклеозид» относится к соединению, содержащему молекулу сахара (например, рибозу в РНК или дезоксирибозу в ДНК), или его производному или аналогу, ковалентно связанному с нуклеотидным основанием (например, пурином или пиримидином) или его производным или аналогом (также называемым в данном документе «нуклеотидным основанием»), но не содержащим межнуклеозидную связывающую группу (например, фосфатную группу). Используемый в данном документе термин «нуклеотид» относится к нуклеозиду, ковалентно связанному с межнуклеозидной связывающей группой (например, фосфатной группой), или к любому его производному, аналогу или модификации, которые придают улучшенные химические и/или функциональные свойства (например, аффинность связывания, резистентность к нуклеазам, химическую стабильность) нуклеиновой

кислоте или ее части или сегменту.

*Открытая рамка считывания:* Используемый в данном документе термин «открытая рамка считывания», сокращенно обозначенный как «ОРС», относится к сегменту или области молекулы мРНК, которая кодирует полипептид. ОРС содержит непрерывный участок непересекающихся кодонов в рамке считывания, начиная с инициирующего кодона и заканчивая стоп-кодоном, и транслируется рибосомой.

*Пациенты:* Используемый в данном документе термин «пациент» относится к субъекту, который может обратиться или нуждается в лечении, требует лечение, получает лечение, получит лечение, или субъект, который находится под наблюдением квалифицированного специалиста в отношении конкретного заболевания или патологического состояния. В конкретных вариантах осуществления пациентом является человеком. В некоторых вариантах осуществления пациентом является пациент, страдающий от рака (например, рака печени или колоректального рака).

*Фармацевтически приемлемый:* Фраза «фармацевтически приемлемый» используется в данном документе для обозначения таких соединений, материалов, композиций и/или лекарственных форм, которые в рамках рационального медицинского решения, являются подходящими для применения в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, соразмерно разумному соотношению пользы/риска.

*Фармацевтически приемлемый наполнитель:* Фраза «фармацевтически приемлемый наполнитель», используемая в данном документе, относится к любому ингредиенту, отличному от соединений, описанных в данном документе (например, носитель, способный суспендировать или растворять активное соединение) и имеющему свойства не вызывать токсичности и воспалительного эффекта для пациента. Наполнители могут включать, например, следующее: антиадгезивы, антиоксиданты, связывающие вещества, покрытия, добавки для прессования, разрыхлители, красящие вещества (красители), мягчительные средства, эмульгаторы, наполнители (разбавители), пленкообразователи или покрытия, вкусоароматические добавки, ароматизаторы, вещества, способствующие скольжению (усилители сыпучести), смазывающие вещества, консерванты, печатные краски, сорбенты, суспендирующие или диспергирующие средства, подсластители и гидратационную

воду. Иллюстративные наполнители включают, без ограничения, следующие: бутилированный гидрокситолуол (BHT), карбонат кальция, фосфат кальция (двухосновный), стеарат кальция, кросскармелозу, сшитый поливинилпирролидон, лимонную кислоту, кросповидон, цистеин, этилцеллюлозу, желатин, гидроксипропилцеллюлозу гидроксипропилметилцеллюлозу, лактозу, стеарат магния, мальтит, маннит, метионин, метилцеллюлозу, метилпарабен, микрокристаллическую целлюлозу, полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, повидон, прежелатинизированный крахмал, пропилпарабен, ретинилпальмитат, шеллак, диоксид кремния, натрий-карбоксиметилцеллюлозу, цитрат натрия, натрий-гликолят крахмала, сорбит, крахмал (кукурузный), стеариновую кислоту, сахарозу, тальк, диоксид титана, витамин А, витамин Е, витамин С и ксилит.

*Фармацевтически приемлемые соли:* Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемые соли» относится к производным раскрытых соединений, в которых исходное соединение модифицировано путем преобразования существующего кислотного или основного фрагмента в его солевую форму (например, путем взаимодействия группы свободного основания с подходящей органической кислотой). Примеры фармацевтически приемлемых солей включают, но не ограничиваются этим, соли минеральных или органических кислот основных остатков, таких как амины; щелочные или органические соли кислых остатков, таких как карбоновые кислоты; и т. д. Репрезентативные кислотно-аддитивные соли включают ацетат, уксусную кислоту, адипинат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензолсульфоновую кислоту, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанепропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидробромид, гидрохлорид, гидроиодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, толуолсульфонат, ундеканоат, валерианат и тому подобное. Репрезентативные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают соли натрия, лития, калия, кальция, магния и тому подобное, а также нетоксичные катионы

аммония, четвертичного аммония и амина, включая, но не ограничиваясь этим, аммоний, тетраметиламмоний, тетраэтиламмоний, метиламин, диметиламин, триметиламин, триэтиламин, этиламин и тому подобное. Фармацевтически приемлемые соли согласно данному раскрытию включают обычные нетоксичные соли исходного соединения, образованные, например, из нетоксичных неорганических или органических кислот. Фармацевтически приемлемые соли согласно данному раскрытию могут быть синтезированы из исходного соединения, которое содержит основной или кислотный фрагмент, обычными химическими способами. Как правило, такие соли могут быть получены взаимодействием форм этих соединений в виде свободной кислоты или основания со стехиометрическим количеством подходящего основания или кислоты в воде или в органическом растворителе или в их смеси; как правило, неводные среды, такие как эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил, являются предпочтительными. Списки подходящих солей можно найти в *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418, *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P.H. Stahl and C.G. Wermuth (eds.), Wiley-VCH, 2008, и Berge et al., *Journal of Pharmaceutical Science*, 66, 1-19 (1977), каждая из которых включена в данный документ во всей полноте посредством ссылки.

*Полипептид:* Используемый в данном документе термин «полипептид» или «представляющий интерес полипептид» относится к полимеру из аминокислотных остатков, обычно соединенных пептидными связями, которые могут быть получены естественным (например, выделены или очищены) или синтетическим путем.

*Преинициирующий комплекс (PIC):* Используемый в данном документе термин «преинициирующий комплекс» (альтернативно «43S преинициирующий комплекс»; сокращенно «PIC») относится к рибонуклеопротеиновому комплексу, содержащему 40S рибосомную субъединицу, эукариотическим факторам инициации (eIF1, eIF1A, eIF3, eIF5 ) и тройному комплексу eIF2-GTP-Met-$tRNA_i^{Met}$, который способен по существу присоединяться к 5'-кэп-структуре молекулы мРНК и после присоединения выполнять рибосомное сканирование 5'-НТО.

*Элемент РНК:* Используемый в данном документе термин «элемент РНК» относится к части, фрагменту или сегменту молекулы РНК, которая обеспечивает биологическую функцию и/или обладает

биологической активностью (например, трансляционной регуляторной активностью). Модификация полинуклеотида путем включения одного или более элементов РНК, таких как описанные в данном документе, обеспечивает одно или более желаемых функциональных свойств для модифицированного полинуклеотида. Элементы РНК, как описано в данном документе, могут быть встречающимися в природе, не встречающимися в природе, синтетическими, сконструированными или любой их комбинацией. Например, элементы природной РНК, которые обеспечивают регуляторную активность, включают элементы, обнаруженные в транскриптомах вирусов, прокариотических и эукариотических организмов (например, людей). Было показано, что элементы РНК, в частности эукариотические мРНК и транслированные вирусные РНК, участвуют в обеспечении многих функций в клетках. Иллюстративные природные элементы РНК включают, но не ограничиваются ими, элементы инициации трансляции (например, участок внутренней посадки рибосомы (IRES), см. Kieft et al., (2001) RNA 7(2):194-206), усиливающие трансляцию элементы (например, усиливающий трансляцию элемент мРНК APP, см. Rogers et al., (1999) J Biol Chem 274(10):6421-6431), элементы стабильности мРНК (например, богатые AU элементы (ARE), см. Garneau et al., (2007) Nat Rev Mol Cell Biol 8(2):113-126), элементы репрессии трансляции (см., например, Blumer et al., (2002) Mech Dev 110(1-2):97-112), белок-связывающие элементы РНК (например, железосвязывающий элемент, см. Selezneva et al., (2013) J Mol Biol 425(18):3301-3310), элементы цитоплазматического полиаденилирования (Villalba et al., (2011) Curr Opin Genet Dev 21(4):452-457), и элементы каталитической РНК (например, рибозимы, см. Scott et al., (2009) Biochim Biophys Acta 1789(9-10):634-641).

*Время пребывания:* Используемый в данном документе термин «время пребывания» относится ко времени нахождения преинициирующего комплекса (PIC) или рибосомы в дискретном положении или местоположении вдоль молекулы мРНК.

*По существу:* Используемый в данном документе термин «по существу» относится к качественному состоянию, демонстрирующему общую или почти полную степень или степень представляющей интерес характеристики или свойства. Специалист в области биологических наук поймет, что биологические и химические явления редко, если вообще когда-либо, доходят до завершения и/или переходят к завершению, достижению или избеганию

абсолютного результата. Таким образом, термин «по существу» используется в данном документе для обозначения потенциального недостатка полноты, присущей многим биологическим и химическим явлениям.

*Страдающий от:* У индивидуума, который «страдает» от заболевания, расстройства и/или патологического состояния, было диагностировано или он имеет один или более симптомов заболевания, расстройства и/или патологического состояния.

*Нацеливающий фрагмент:* Используемый в данном документе термин «нацеливающий фрагмент» представляет собой соединение или агент, который может нацеливать наночастицу на конкретный тип клетки, ткани и/или органа.

*Терапевтический агент:* Термин «терапевтический агент» относится к любому агенту, который при введении субъекту обладает терапевтическим, диагностическим и/или профилактическим эффектом и/или вызывает желаемый биологический и/или фармакологический эффект.

*Трансфекция:* Используемый в данном документе термин «трансфекция» относится к способам введения препарата (например, полинуклеотида, такого как мРНК) в клетку.

*Трансляционная регуляторная активность:* Используемый в данном документе термин «трансляционная регуляторная активность» (используется взаимозаменяемо с «трансляционной регуляторной функцией») относится к биологической функции, механизму или процессу, который модулирует (например, регулирует, влияет, контролирует, изменяет) активность трансляционного аппарата, включая активность PIC и/или рибосомы. В некоторых аспектах желаемая трансляционная регуляторная активность способствует и/или повышает точность трансляции мРНК. В некоторых аспектах желаемая трансляционная регуляторная активность уменьшает и/или ингибирует ослабленное сканирование. *Субъект:* Используемый в данном документе термин «субъект» относится к любому организму, которому можно вводить композицию в соответствии с данным раскрытием, например, для экспериментальных, диагностических, профилактических и/или терапевтических целей. Иллюстративные субъекты включают животных (например, млекопитающих, таких как мыши, крысы, кролики, приматы, отличные от человека, и люди) и/или растения. В некоторых вариантах осуществления субъектом может быть пациент.

*Лечение:* Используемый в данном документе термин «лечение»

относится к частичному или полному облегчению, ослаблению, улучшению, облегчению, задержке начала, ингибированию прогрессирования, уменьшению тяжести и/или уменьшению частоты возникновения одного или более симптомов или проявлений конкретной инфекции, заболевания, расстройства и/или патологического состояния. Например, «лечение» рака может относиться к ингибированию выживания, роста и/или распространения опухоли. Лечение может быть назначено субъекту, у которого нет признаков заболевания, расстройства и/или патологического состояния, и/или субъекту, у которого проявляются только ранние признаки заболевания, расстройства и/или патологического состояния, с целью снижения риска развития патологии, связанной с заболеванием, расстройством и/или патологическим состоянием.

*Предотвращение:* Используемый в данном документе термин «предотвращение» относится к частичному или полному ингибированию появления одного или более симптомов или проявлений конкретной инфекции, заболевания, расстройства и/или патологического состояния.

*Опухоль:* Как используется в данном документе «опухоль» представляет собой аномальный рост ткани, будь то доброкачественный или злокачественный.

*Немодифицированный:* Используемый в данном документе термин «немодифицированный» относится к любому веществу, соединению или молекуле до того, как он будет каким-либо образом изменен. Немодифицированный может, но не всегда, относиться к дикому типу или нативной форме биомолекулы. Молекулы могут подвергаться серии модификаций, в результате чего каждая модифицированная молекула может служить в качестве «немодифицированной» исходной молекулы для последующей модификации.

*Содержание уридина:* Термины «содержание уридина» или «содержание урацила» являются взаимозаменяемыми и относятся к количеству урацила или уридина, присутствующего в определенной последовательности нуклеиновой кислоты. Содержание уридина или урацила может быть выражено как абсолютное значение (общее количество уридина или урацила в последовательности) или относительное (процентное содержание уридина или урацила по отношению к общему числу нуклеотидных оснований в последовательности нуклеиновой кислоты).

*Уридин-модифицированная последовательность:* Термины

«уридин-модифицированная последовательность» относятся к оптимизированной по последовательности нуклеиновой кислоте (например, к синтетической последовательности мРНК) с различным общим или локальным содержанием уридина (более высоким или низким содержанием уридина) или с различными структурами уридина (например, градиентное распределение или кластеризация) в отношении содержания уридина и/или структуры уридина предполагаемой последовательности нуклеиновой кислоты. В содержании данного раскрытия термины «уридин-модифицированная последовательность» и «урацил-модифицированная последовательность» считаются эквивалентными и взаимозаменяемыми.

«Кодон с высоким уровнем уридина» определяется как кодон, содержащий два или три уридина, «кодон с низким уровнем уридина» определяется как кодон, содержащий один уридин, и «безуридиновый кодон» представляет собой кодон без каких-либо уридинов. В некоторых вариантах осуществления уридин-модифицированная последовательность содержит замены кодонов с высоким уровнем уридина кодонами с низким уровнем уридина, замены кодонов с высоким уровнем уридина кодонами без уридина, замены кодонов с низким уровнем уридина кодонами с высоким уровнем уридина, замены кодонов с низким уровнем уридина кодонами без уридина, замена кодонов без уридина кодонами с низким уровнем уридина, замена кодонов без уридина кодонами с высоким уровнем уридина и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления кодон с высоким уровнем уридина может быть заменен другим кодоном с высоким уровнем уридина. В некоторых вариантах осуществления кодон с низким уровнем уридина может быть заменен другим кодоном с низким уровнем уридина. В некоторых вариантах осуществления кодон без уридина может быть заменен другим кодоном без уридина. Уридин-модифицированная последовательность может быть обогащенной уридином или обедненный уридином.

Обогащенная уридином: Используемые в данном документе термины «обогащенный уридином» и грамматические варианты относятся к увеличению содержания уридина (выраженного в абсолютном значении или в процентном значении) в оптимизированной по последовательности нуклеиновой кислоте (например, синтетической последовательности мРНК) по отношению к содержанию уридина в соответствующей кандидатной последовательности нуклеиновой кислоты. Обогащение уридином

может быть осуществлено путем замены кодонов в предполагаемой последовательности нуклеиновой кислоты синонимичными кодонами, содержащими меньше нуклеотидных оснований уридина. Обогащение уридином может быть глобальным (т.е. относительно всей длины предполагаемой последовательности нуклеиновой кислоты) или локальным (т.е. относительно подпоследовательности или области предполагаемой последовательности нуклеиновой кислоты).

*Обедненная уридином:* Используемые в данном документе термины «обедненный уридином» и грамматические варианты относятся к уменьшению содержания уридина (выраженного в абсолютном значении или в процентном значении) в оптимизированной по последовательности нуклеиновой кислоте (например, синтетической последовательности мРНК) по отношению к содержанию уридина в соответствующей кандидатной последовательности нуклеиновой кислоты. Обеднение уридином может быть осуществлено путем замены кодонов в предполагаемой последовательности нуклеиновой кислоты синонимичными кодонами, содержащими меньше нуклеотидных оснований уридина. Обеднение уридином может быть глобальным (т.е. относительно всей длины предполагаемой последовательности нуклеиновой кислоты) или локальным (т.е. относительно подпоследовательности или области предполагаемой последовательности нуклеиновой кислоты).

**Эквиваленты и объем**

Специалисты в данной области техники распознают или смогут установить, используя не более чем обычные эксперименты, множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления в соответствии с раскрытым в данном документе описанием. Объем данного раскрытия не предназначен для ограничения нижеприведенным описанием, а скорее соответствует изложенному в прилагаемой формуле изобретения.

В формуле изобретения формы единственного числа могут означать один или более чем один, если не указано иное или это иным образом не очевидно из контекста. Пункты формулы изобретения или описания, которые включают «или» между одним или более членами группы, считаются удовлетворенными, если один, более одного или все члены группы присутствуют, применяются или имеют отношение к определенному продукту или способу, если не указано иное или это иным образом не очевидно из контекста. Описание изобретения включает в себя варианты осуществления изобретения, в которых ровно один член группы присутствует в,

применяется в или иным образом относится к данному продукту или способу. Описание изобретения включает в себя варианты осуществления изобретения, в которых более чем один из группы членов присутствует в, применяется в или иным образом относится к данному продукту или способу.

Также отмечается, что термины «содержащий», «содержат», «содержит», «имеющий», «иметь» и «имеет» предназначены для того, чтобы быть открытыми и допускать включения дополнительных элементов или этапов, но не требует этого. Когда эти термины используются в данном документе, термин «состоящий из», таким образом, также охватывается и раскрывается.

Когда указаны диапазоны, включаются конечные точки. Кроме того, следует понимать, что если не указано иное или это иным образом не очевидно из контекста и понимания специалиста в данной области техники, значения, которые выражаются как диапазоны, могут принимать любое конкретное значение или поддиапазон в указанных диапазонах в разных вариантах осуществления изобретения, до десятой части единицы нижнего предела диапазона, если из контекста явно следует иное.

Все цитируемые источники, например, ссылки, публикации, базы данных, записи в базах данных и статьи, цитируемые в данном документе, включены в данную заявку посредством ссылки, даже если это прямо не указано в цитировании. В случае противоречивых утверждений цитируемого источника и данной заявки, утверждение в данной заявке имеет преимущественную силу.

**Примеры**

Раскрытие будет более полно понято с помощью ссылки на следующие примеры. Однако их не следует рассматривать как ограничивающие объем раскрытия. Понятно, что примеры и варианты осуществления, описанные в данном документе, предназначены только для иллюстративных целей и что различные модификации или изменения в их свете будут предложены специалистам в данной области техники и должны быть включены в сущность и сферу применения этой заявки и объема прилагаемой формулы изобретения.

**Пример 1: Конструкты иммуностимуляторной мРНК STING**

В данном примере был создан ряд конструктов ммРНК, которые кодируют конститутивно активированные формы STING человека, и конструкты были протестированы на их способность стимулировать продукцию интерферона-β (ИФН-β). Белок STING человека, кодируемый этими конструктами, был конститутивно активирован

путем введения одной или более точечных мутаций. Следующие одиночные или комбинированные точечные мутации были протестированы: (i) V155M; (ii) R284T; (iii) V147L/N154S/V155M; и (iv) R284M/V147L/N154S/V155M. Данные конструкты обычно также кодируют эпитопную метку на N-конце или C-конце для облегчения обнаружения. Были проверены различные эпитопные метки (FLAG, Myc, CT, HA, V5). Кроме того, все конструкты, содержащие кэп 1 5′ Cap (7mG(5')ppp(5')NlmpNp), 5'-HTO, 3'-HTO, поли(A)-хвост из 100 нуклеотидов, и были полностью модифицированы 1-метил-псевдоуридином (m1ψ). Аминокислотные последовательности ОРС репрезентативных конститутивно активных конструктов STING человека без какой-либо эпитопной метки приведены в SEQ ID NO: 1-10. Иллюстративная 5'-HTO для применения в конструктах приведена в SEQ ID NO: 21. Иллюстративная 3'-HTO для применения в конструктах приведена в SEQ ID NO: 22. Иллюстративная 3′-HTO, содержащая сайты связывания miR-122 и miR-142.3p, для применения в конструктах показана в SEQ ID NO: 23.

Чтобы определить, могут ли конститутивно активные конструкты STING стимулировать продукцию ИФН-β, конструкты были трансфицированы в клетки TF1a человека. Конструкты человеческого и мышиного STING дикого типа (неконститутивно активные) использовали в качестве отрицательных контролей. Двадцать пять тысяч клеток на лунку высевали в 96-луночные планшеты, и конструкты ммРНК (250 нг) трансфицировали в них с использованием Lipofectamine 2000. Через 24 и 48 часов супернатанты собирали и определяли уровни ИФН-β при помощи стандартного ИФА. Результаты, которые показаны на **Фиг.** 1, демонстрируют, что конститутивно активные конструкты STING стимулировали продукцию ИФН-β по сравнению с диким типом (не конститутивно активными) контрольными группами STING человека и мыши. В то время как все четыре мутантных конструкта STING стимулировали продукцию ИФН-β, мутант V155M и мутант R284T проявили наибольшую активность. Эти результаты демонстрируют способность конститутивно активных конструктов мРНК STING усиливать иммунные ответы посредством стимуляции продукции ИФН-β.

Во второй серии экспериментов репортерный ген, транскрипция которого интерферон-стимулируемым реагирующим элементом (ISRE), использовали для проверки способности панели конститутивно активных конструктов мРНК STING активировать ISRE в репортерной мышиной линии клеток STING KO. Результаты, которые показаны на

**Фиг.** 2, демонстрируют, что конститутивно активные конструкты STING стимулировали экспрессию репортерного гена, что указывает на то, что конструкты были способны активировать интерферон-стимулируемый реагирующий элемент (ISRE).

**Пример 2: Конструкты иммуностимуляторных мРНК IRF3 и IRF7**

В этом примере был создан ряд конструктов ммРНК, которые кодируют конститутивно активированные формы IRF3 или IRF7, и конструкты были протестированы на их способность активировать интерферон-стимулируемый реагирующий элемент (ISRE). Аминокислотные последовательности ОРС репрезентативных конститутивно активных конструктов IRF3 мыши и человека, содержащих точечную мутацию S396D, без какой-либо эпитопной метки приведены в SEQ ID NO: 11-12. Аминокислотная последовательность ОРС конструкта человеческого IRF7 дикого типа без какой-либо эпитопной метки приведена в SEQ ID NO: 13. Аминокислотные последовательности ОРС репрезентативных конститутивно активных конструктов IRF7 человека без какой-либо эпитопной метки приведены в SEQ ID NO: 14-18. Аминокислотные последовательности ОРС репрезентативных конструктов укороченных IRF7 человека (неактивные «нулевые» мутации) без какой-либо эпитопной метки приведены в SEQ ID NO: 19-20. Данные конструкты обычно также кодируют эпитопную метку на N-конце или С-конце для облегчения обнаружения. Были проверены различные эпитопные метки (FLAG, Myc, CT, HA, V5). Кроме того, все конструкты, содержащие кэп 1 5′ Cap (7mG(5')ppp(5')NlmpNp), 5'-НТО, 3'-НТО, поли(А)-хвост из 100 нуклеотидов, и были полностью модифицированы 1-метил-псевдоуридином (m1ψ). Иллюстративная 5'-НТО для применения в конструктах приведена в SEQ ID NO: 21. Иллюстративная 3'-НТО для применения в конструктах приведена в SEQ ID NO: 22. Иллюстративная 3′-НТО, содержащая сайты связывания miR-122 и miR-142.3p, для применения в конструктах показана в SEQ ID NO: 23.

Репортерный ген, транскрипция которого управлялась интерферон-стимулируемый реагирующий элемент (ISRE), использовали для проверки способности конститутивно активных конструктов мРНК IRF3 и IRF7 активировать ISRE. Результаты, которые показаны на **Фиг. 3А-3В**, демонстрируют, что конститутивно активные конструкты IRF3 (**Фиг. 3А**) и конститутивно активные конструкты IRF7 (**Фиг. 3В**) стимулировали экспрессию репортерного гена, что указывает на то, что конструкты были способны

активировать интерферон-стимулируемый реагирующий элемент (ISRE).

**Пример 3: Конструкты иммуностимуляторных мРНК IKKβ, cFLIP и RIPK1**

В данном примере репортерный ген люциферазы, транскрипция которого управлялась сигнальным путем NFκB, был использован для тестирования способности конститутивно активных конструктов мРНК IKK, cFLIP и RIPK1 активировать сигнальный путь NFκB.

Конститутивно активный конструкт IKKβ содержал следующие две точечные мутации: S177E/S181E. Конститутивно активные конструкты IKKα или IKKβ содержали мутации PEST. Аминокислотные последовательности ОРС конститутивно активных конструктов IKKβ без какой-либо эпитопной метки приведены в SEQ ID NO: 87-90. Аминокислотные последовательности ОРС конститутивно активных конструктов IKKα или IKKβ, содержащих мутацию PEST, без какой-либо эпитопной метки приведены в SEQ ID NO: 91-98. Конститутивно активные конструкты cFLIP содержали cFLIP-L, cFLIP-S (ак 1-227), cFLIP p22 (ак 1-198), cFLIP p43 (ак 1-376) или cFLIP p12 (ак 377-480). Аминокислотные последовательности ОРС конструктов cFLIP без какой-либо эпитопной метки приведены в SEQ ID NO: 82-86. Структуры различных конститутивно активных конструктов RIPK1 дополнительно описаны, например, в Yatim, N. et al. (2015) *Science* 350:328-334 или Orozco, S. et al. (2014) *Cell Death Differ.* 21:1511-1521. Аминокислотные последовательности ОРС конститутивно активных конструктов RIPK1 без какой-либо эпитопной метки приведены в SEQ ID NO: 99-104. В дополнение к открытой рамке считывания, все конструкты, содержащие кэп 1 5' Cap (7mG(5')ppp(5')NlmpNp), 5'-НТО, 3'-НТО, поли(А)-хвост из 100 нуклеотидов, и были полностью модифицированы 1-метил-псевдоуридином (m1ψ). Иллюстративная 5'-НТО для применения в конструктах приведена в SEQ ID NO: 21. Иллюстративная 3'-НТО для применения в конструктах приведена в SEQ ID NO: 22. Иллюстративная 3'-НТО, содержащая сайты связывания miR-122 и miR-142.3p, для применения в конструктах показана в SEQ ID NO: 23.

В первой серии экспериментов конструкты или cFLIP, или IKKβ (12,5 нг РНК) трансфицировали в клетки B16F10, MC38 или HEK293 вместе с репортерным геном NFκB-luc, и проводили анализ репортерного гена двойной люциферазы через 24 часа после трансфекции в качестве индикатора активации сигналинга NFκB.

Результаты, которые показаны на **Фиг. 4**, демонстрируют, что конститутивно активные конструкты cFLIP и IKKβ стимулировали экспрессию репортерного гена, что указывает на то, что конструкты были способны активировать сигнальный путь NFκB. Во второй серии экспериментов конструкты RIPK1 трансфицировали в клетки B16F10 вместе с репортерным геном NFκB-luc, и проводили анализ репортерного гена двойной люциферазы через 24 часа после трансфекции в качестве индикатора активации сигналинга NFκB. Результаты, которые показаны на **Фиг. 5**, демонстрируют, что конститутивно активные конструкты RIPK1 стимулировали экспрессию репортерного гена, что указывает на то, что конструкты были способны активировать сигнальный путь NFκB.

**Пример 4: Конструкты иммуностимуляторной мРНК DIABLO**

В данном примере был создан ряд конструктов ммРНК, которые кодируют DIABLO, и конструкты были протестированы на их способность индуцировать продукцию цитокинов. Данные конструкты обычно также кодируют эпитопную метку на N-конце или C-конце для облегчения обнаружения. Были проверены различные эпитопные метки (FLAG, Myc, CT, HA, V5). Кроме того, все конструкты, содержащие кэп 1 5′ Cap (7mG(5')ppp(5')NlmpNp), 5'-НТО, 3'-НТО, поли(A)-хвост из 100 нуклеотидов, и были полностью модифицированы 1-метил-псевдоуридином (m1ψ). Аминокислотные последовательности ОРС конструктов DIABLO без какой-либо эпитопной метки приведены в SEQ ID NO: 106-113. Иллюстративная 5'-НТО для применения в конструктах приведена в SEQ ID NO: 21. Иллюстративная 3'-НТО для применения в конструктах приведена в SEQ ID NO: 22. Иллюстративная 3′-НТО, содержащая сайты связывания miR-122 и miR-142.3p, для применения в конструктах показана в SEQ ID NO: 23.

Чтобы определить, могут ли конструкты DIABLO индуцировать продукцию цитокинов, конструкты трансфицировали в клетки SKOV3. Десять тысяч клеток на лунку высевали в 96-луночные планшеты, и конструкты ммРНК трансфицировали в них с использованием Lipofectamine 2000. Была измерена стимуляция продукции цитокинов конструктами ммРНК DIABLO в клетках SKOV3. Результаты, которые показаны на **Фиг. 6** для ФНО-α и на **Фиг. 7** для интерлейкина 6 (ИЛ-6), демонстрируют, что ряд конструктов ммРНК DIABLO стимулирует продукцию цитокинов клетками SKOV3.

**Пример 5: Иммуностимуляторные мРНК усиливают ответы в отношении вакцины против рака MC38**

В данном примере исследованы специфическая активность и устойчивость ответов на противораковую вакцину на основе мРНК MC38, используемую в комбинации с конструктами иммуностимуляторных STING, IRF3 или IRF7. Модель мышиной опухоли MC38 использовали для идентификации иммуногенных мутантных пептидов, содержащих неоэпитопы, способные стимулировать противоопухолевые Т-клеточные ответы (см., например, Yadav, M. et al. (2014) *Nature* 515:572-576). Таким образом, подход к вакцинации против рака, который приводит к устойчивому и длительному иммунному ответу против опухолевых неоэпитопов, является весьма желательным.

Вакцина на основе MC38, использованная в данном примере, представляла собой конструкт мРНК, кодирующий конкатемер ADR трех 25-мерных мутантных пептидов, содержащих опухолевые неоэпитопы, полученные из Adpgk, Dpagt1 и Reps1 (данная вакцина также упоминается в данном документе как ADRvax). Конструкт мРНК кодирует открытую рамку считывания, приведенную в SEQ ID NO: 120, которая также содержит N-концевой His-tag (гистидиновую метку) для легкого обнаружения. Мышей иммунизировали внутримышечно вакциной на основе мРНК ADRvax (в дозе 0,25 мг/кг) на 0-е и 14-е сутки в комбинации с контрольным конструктом мРНК (NTFIX) или с конструктом иммуностимуляторной мРНК STING, IRF3 или IRF7 (в дозе 0,25 мг/кг). Конститутивно активный иммуностимулятор STING содержал мутацию V155M (мышиный вариант, соответствующий SEQ ID NO: 1). Конститутивно активный иммуностимулятор IRF3 содержал мутацию S396D (соответствующий SEQ ID NO: 12). Конститутивно активный иммуностимулятор IRF7 содержал внутреннюю делецию и шесть точечных мутаций (мышиный вариант, соответствующий SEQ ID NO: 18). Конструкт вакцины на основе MC38 и генетический адъювантный конструкт совместно составляли в липидные наночастицы MC3.

На 21-е и 35-е сутки $CD8^+$ клетки селезенки мышей в каждой тестируемой группе повторно стимулировали ex vivo в течение 4 часов при 37 градусах C в присутствии GolgiPlug™ (содержащего брефельдин A; BD Biosciences) с пептидами ADR дикого типа или мутантными MC38 (1 мкг/мл на пептид) и ответы на CD8 вакцины оценивали путем внутриклеточного окрашивания (ICS) для ИФН-γ. Репрезентативные данные ICS для ответов, специфических для ADR MC38, на 21-е сутки и 35-е сутки для $CD8^+$ клеток селезенки по ИФН-γ представлены на **Фиг. 8A** (21-е сутки) и **Фиг. 8B** (31-е

сутки). Подобные результаты наблюдали для ICS на ФНО-α и для $CD8^+$МКПК. Результаты демонстрируют, что ответы на CD8 вакцины были значительно усилены иммуностимуляторным конструктом STING и умеренно усилены иммуностимуляторными конструктами IRF3 и IRF7. Первоначальное улучшение антигенспецифического ответа CD8 для мышей, получавших иммуностимуляторы, наблюдалось на 21-е сутки (примерно 5% против 1% для лечения STING по сравнению с контролем), которые продолжали улучшаться на 35-е сутки (до 15% для лечения STING по сравнению с контролем), тем самым демонстрируя продолжительность ответа.

Также был исследован процент $CD8b^+$ клеток среди живых $CD45^+$ клеток. Результаты для клеток селезенки и МКПК на 35-е сутки, которые приведены на **Фиг. 9A**, демонстрируют, что генетические адъюванты увеличивают общую популяцию $CD8b^+$. Как продемонстрировано на **Фиг. 9B**, большинство $CD8^+$ клеток селезенки и МКПК, как было установлено, имеют фенотип эффекторных $CD62L^{lo}$ клеток памяти. Дополнительные эксперименты с окрашиванием продемонстрировали, что иммуностимуляторный конструкт STING и IRF7 немного снижал % общего количества $Foxp3^+$ Treg CD4 T -клеток (данные не показаны). Дополнительные эксперименты с окрашиванием показали, что иммуностимуляторы не изменяли % $CD138^+$ плазмобластов (данные не показаны).

**Пример 6: Конструкты мРНК KRAS-STING**

Сообщалось о всестороннем исследовании мутаций Ras при различных типах рака (Prior, I.A. et al. (2012) *Cancer Res.* 72:2457-2467). Данное исследование продемонстрировало, что тремя наиболее частыми мутациями KRAS при колоректальном раке, раке поджелудочной железы и немелкоклеточном раке легкого являются G12D, G12V, G13D и G12C. Был подготовлен ряд конструктов мРНК мутантного KRAS, которые кодируют один или более пептидов KRAS, содержащих одну из этих четырех мутаций, для применения в качестве противоопухолевых вакцин на основе мРНК KRAS. Кроме того, для изучения влияния иммуностимуляторов на основе мРНК на ответы на KRAS-вакцины был приготовлен ряд конструктов мРНК, которые кодируют один или более мутантных пептидов KRAS, связанных на N-конце или C-конце, с последовательностью, кодирующей STING, в качестве иммунностимулятора. Таким образом, в этих конструктах мРНК KRAS-STING вакцинный антиген(ы) и иммуностимулятор кодируются одним и тем же конструктом мРНК.

Были получены конструкты мРНК мутантного пептида KRAS,

которые кодировали: 15-мерный пептид, имеющий мутацию G12D, G12V или G13D (аминокислотная последовательность, которого приведена в SEQ ID NO: 36-38, соответственно); 25-мерный пептид, имеющий мутацию G12D, G12V или G13D (SEQ ID NO: 39-41, соответственно); три копии 15-мерного пептида, имеющего мутацию G12D, G12V или G13D (SEQ ID NO: 42-44, соответственно); или три копии 25-мерного пептида, имеющего мутацию G12D, G12V или G13D (SEQ ID NO: 45-47, соответственно). Дополнительные конструкты кодировали одну копию или три копии 25-мерного пептида, имеющего мутацию G12C (SEQ ID NO: 72-73 соответственно) или 25-мерный пептид дикого типа (SEQ ID NO: 74). В некоторых вариантах осуществления мутация G12C KRAS может использоваться в комбинации с мутацией G12D, G12V или G13D или их комбинациями. Нуклеотидные последовательности, кодирующие эти мутантные пептиды KRAS, представлены в Примере 7.

Были получены конструкты мРНК мутантного пептида KRAS-STING, имеющие STING-кодирующую последовательность на N-конце, которая кодировала: 15-мерный пептид, имеющий мутацию G12D, G12V или G13D (аминокислотная последовательность, которого приведена в SEQ ID NO: 48-50, соответственно); 25-мерный пептид, имеющий мутацию G12D, G12V или G13D (SEQ ID NO: 51-53, соответственно); три копии 15-мерного пептида, имеющего мутацию G12D, G12V или G13D (SEQ ID NO: 54-56, соответственно); или три копии 25-мерного пептида, имеющего мутацию G12D, G12V или G13D (SEQ ID NO: 57-59, соответственно). В некоторых вариантах осуществления мутация G12C KRAS может использоваться в комбинации с мутацией G12D, G12V или G13D или их комбинациями. Репрезентативные нуклеотидные последовательности, кодирующие эти конструкты пептида KRAS-STING, имеющие STING-кодирующую последовательность на N-конце, приведены в SEQ ID NO: 160 и 162.

Были получены конструкты мРНК мутантного пептида KRAS-STING, имеющие STING-кодирующую последовательность на C-конце, которая кодировала: 15-мерный пептид, имеющий мутацию G12D, G12V или G13D (аминокислотная последовательность, которого приведена в SEQ ID NO: 60-62, соответственно); 25-мерный пептид, имеющий мутацию G12D, G12V или G13D (SEQ ID NO: 63-65, соответственно); три копии 15-мерного пептида, имеющего мутацию G12D, G12V или G13D (SEQ ID NO: 66-68, соответственно); или три копии 25-мерного пептида, имеющего мутацию G12D, G12V или G13D (SEQ ID NO: 69-70, соответственно). В некоторых вариантах осуществления

мутация G12C KRAS может использоваться в комбинации с мутацией G12D, G12V или G13D или их комбинациями. Репрезентативные нуклеотидные последовательности, кодирующие эти конструкты пептида KRAS-STING, имеющие STING-кодирующую последовательность на С-конце, приведены в SEQ ID NO: 161 и 163.

Данные конструкты также могут кодировать эпитопную метку на N-конце или С-конце для облегчения обнаружения. Могут быть использованы разные эпитопные метки (например, FLAG, Myc, CT, HA, V5). Кроме того, все конструкты, содержащие кэп 1 5′ Cap (7mG(5')ppp(5')NlmpNp), 5'-НТО, 3'-НТО, поли(А)-хвост, и были полностью модифицированы 1-метил-псевдоуридином (m1ψ). Иллюстративная 5'-НТО для применения в конструктах приведена в SEQ ID NO: 21. Иллюстративная 3'-НТО для применения в конструктах приведена в SEQ ID NO: 22. Иллюстративная 3′-НТО, содержащая сайты связывания miR-122 и miR-142.3p, для применения в конструктах показана в SEQ ID NO: 23.

Для анализа ответов на вакцины у мышей, получавших или конструкт вакцины на основе мРНК мутантного пептида(ов) KRAS, или конструкт мРНК мутантного пептида(ов) KRAS-иммуностимулятора STING, мышей (HLA-A*11:01 или HLA-A*) 2:01; Taconic) иммунизировали конструктом вакцины на основе мРНК мутантного пептида KRAS (например, кодирующим один из SEQ ID NO: 36-47) или конструктом мРНК мутантного пептида(ов) KRAS-иммуностимулятора STING (например, кодирующий один из SEQ ID NO: 48-71). Мышей иммунизируют внутримышечно на 1-е и 15-е сутки (0,5 мг/кг) и умерщвляют на 22-е сутки. Чтобы проверить ответы в отношении CD8 вакцины, $CD8^+$ клетки селезенки и МКПК повторно стимулируют ex vivo в течение 5 часов при 37 градусах С в присутствии GolgiPlug™ (содержащего брефельдин А; BD Biosciences) или мутантными пептидами KRAS (G12D, G12V или G13D), или пептидом KRAS дикого типа (2 мкг/мл на пептид). Ответы в отношении CD8 вакцины можно затем оценить путем внутриклеточного окрашивания (ICS) на ИФН-γ и/или ФНО-α. Усиленные ответы ICS для ИФН-γ и/или ФНО-α у мышей, получавших вакцину на основе мутантного пептида KRAS с конструктом иммуностимуляторной мРНК STING, по сравнению с лечением конструктом мРНК-вакцины на основе мутантного пептида KRAS, указывает на то, что иммуностимулятор STING усиливает KRAS-специфические ответы в отношении CD8 вакцины.

**Пример 7: Применение конструкта иммуностимуляторной мРНК в комбинации с конструктами мРНК KRAS-пептида с активирующей**

**онкогенной мутацией**

В данном примере конструкты мРНК мутантного пептида KRAS используются в комбинации с отдельной конститутивно активным конструктом иммуностимуляторной мРНК STING для усиления иммунных ответов на мутантные пептиды KRAS.

Наиболее часто мутируемым онкогеном при раке является KRAS, который мутирует примерно в 30% случаев онкологических заболеваний эпителия, в первую очередь рака легкого, колоректального рака и поджелудочной железы (Pylayeva-Gupta Y, et al., Nat Rev Cancer, Vol. 11(11): 761-774, 2011). 4 наиболее распространенных мутантных антигена KRAS при этих трех злокачественных опухолях - это G12D, G12V, G13D и G12C, которые составляют 80-90% мутаций KRAS (Prior et al. Cancer Res. 2012 May 15; 72(10): 2457-2467; Cox AD et al, Nat Rev Drug Discov, Vol. 13(11): 828-851, 2011). Мутации KRAS происходят в основном в паре «горячих точек мутагенеза» и активируют онкоген. Предыдущие исследования показали ограниченную способность количественно увеличивать Т-клетки, специфические в отношении онкогенной мутации. Тем не менее, многое из этого было сделано в контексте наиболее распространенного аллеля HLA (A2, который встречается у ~ 50% представителей европеоидной расы). Совсем недавно было продемонстрировано, что (a) специфические Т-клетки могут вырабатываться против точечных мутаций в отношении менее распространенных аллелей HLA (A11, C8) и (b) выращивание данных клеток ex-vivo и введение их обратно пациенту опосредовало резкий ответ опухоли у пациента с раком легкого. (N Engl J Med 2016; 375:2255-2262December 8, 2016DOI: 10.1056/NEJMoa1609279).

Мутации KRAS встречаются примерно в 40% случаев злокачественных новообразованиях толстой кишки. Как показано в Таблице 5 ниже, при CRC (колоректальный рак) только 3 мутации (G12V, G12D и G13D) составляют 96% мутаций KRAS у этой злокачественной опухоли. Кроме того, все пациентом с CRC устанавливают стандартную мутацию в отношении KRAS как стандарт лечения.

**Таблица 5**

| **COSMIC* учет вариантов** | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Все типы рака** | **%** | **CRC** | **%** |
| **G12S** | 1849 | 1% | | |
| **G12V** | 9213 | 4% | 5215 | 29% |
| **G12C** | 435 | 2% | | |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **G12D** | 13634 | 7% | 8083 | 44% |
| **G12A** | 2179 | 1% | | |
| **G12R** | 1244 | 1% | | |
| **G13D** | 5084 | 2% | 4267 | 23% |
| | | 18% | | 96% |
| **Тестируемые** | 208629 | | 18271 | |

*http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?In=KRAS

В другом наборе данных COSMIC 73,68% мутаций KRAS при колоректальном раке приходится на эти 3 мутации (G12V, G12D и G13D) (Таблица 6).

**Таблица 6**

| | **рак толстой кишки** | **%** | **рак прямой кишки** | **%** | **общая** | **%** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **12D** | 635 | 35,04 | 178 | 33,46 | 813 | 34,68 |
| **12V** | 364 | 20,09 | 124 | 23,31 | 488 | 20,82 |
| **13D** | 338 | 18,65 | 88 | 16,54 | 426 | 18,17 |
| | | | | | | 73,68 |

Prior *et al.* исследовали и обобщили изоформ-специфические точечные мутации в отношении HRAS, KRAS и NRAS, соответственно. Данные, представляющие общее количество опухолей с каждой точечной мутацией, были собраны из выпуска COSMIC v52. Сообщается о наиболее частых мутациях для каждой изоформы в отношении каждого типа рака (см. Таблицу 2 Prior *et al.*). Кроме того, вторичные мутации KRAS были выявлены у пациентов, устойчивых к блокаде EGFR. RAS находится ниже EGFR, и было обнаружено, что он представляет собой механизм устойчивости к методам лечения блокадой EGFR. Композиции и способы, описанные в данном документе могут быть нацелены на мутантные опухоли KRAS, устойчивые к блокаде EGFR. В нескольких случаях у одного и того же пациента было выявлено более одной мутации KRAS (одновременно могут встречаться до четырех разных мутаций). Diaz *et al.* сообщает об этих вторичных мутациях KRAS после установления блокады EGFR (см. дополнительную Таблицу 2), и Misale *et al.* сообщает о вторичных мутациях KRAS после блокады EGFR (см. Фиг. 3b) (Diaz *et al.* The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers, Nature 486: 537 (2012); Misale *et al.* Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer, Nature 486: 532 (2012)). Этот спектр мутаций, по-видимому, несколько отличается от мутантов первичной опухоли при колоректальном

раке. Как показано на **Фиг. 10**, на основе анализа данных, доступных в cBioPortal и Prior *et al*. NRAS также мутирует при колоректальном раке, но с меньшей частотой, чем KRAS.

В дополнение к идентификации мутаций KRAS при колоректальном раке, такие мутации были обнаружены при немелкоклеточной карциноме легкого и раке поджелудочной железы. В Таблице 7 приведены частоты четырех мутаций KRAS при этих трех видах рака.

**Таблица 7**

| **Аллель KRAS** | **НМРЛ[1] (30% мутантного KRAS[4]) % повреждений** | **Колоректальный рак[2] (45% мутантного KRAS[4]) % повреждений** | **Рак поджелудочной железы[3] (95% мутантного KRAS[4]) % повреждений** |
|---|---|---|---|
| G12C | 46% | 8% | 2% |
| G12V | 20% | 22% | 30% |
| G12D | 11% | 36% | 51% |
| G13D | 3% | 19% | <1% |
| общая | 80% | 85% | 83% |

[1]Mellema et al. Comparison of clinical outcome after first-line platinum-based chemotherapy in different types of KRAS mutated advanced NSCLC, Lung Cancer 90:2 (2015) (Таблица 1)

[2]Neumann et al, Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer, Pathology Research and Practice 205 (2009) (Фиг. 1)

[3]Kirsten L. Bryant, Joseph D. Mancias, Alec C. Kimmelman, Channing J. Der, KRAS: feeding pancreatic cancer proliferation, In Trends in Biochemical Sciences, 39:2, 2014 (Фиг. 2)

[4]Adrienne D. Cox et al., Drugging the undruggable RAS: Mission Possible?, Nature Reviews Drug Discovery 13, 828-851 (2014) (Таблица 1)

В данном примере животным вводят иммуномодулирующую терапевтическую композицию, которая содержит мРНК, кодирующую по меньшей мере один пептид с активирующей онкогенной мутацией, например, по меньшей мере одну активирующую мутацию KRAS, отдельно или в комбинации с конструктом иммуностимуляторной мРНК, например, конститутивно активный конструкт мРНК STING, например, кодирующий последовательность, как показано в любой из SEQ ID NO: 1-10, такой как, например, конструкт мРНК, кодирующий конститутивно активный белок STING человека, содержащий мутацию

V155M, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, и кодирующий нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 139.

Иллюстративные последовательности мутантных пептидов KRAS и конструкты мРНК приведены в Таблицах 8-10.

**Таблица 8: Последовательности мутантных пептидов KRAS**

| | **Последовательность 9 AA** | **15mer** | **25mer** |
|---|---|---|---|
| **G12D** | VVGADGVGK (SEQ ID NO:121) | MKLVVVGADGVGKSAL (SEQ ID NO:36) | MTEYKLVVVGADGVGKSALT IQLIQ (SEQ ID NO:39) |
| **G12V** | VVGAVGVGK (SEQ ID NO:122) | MKLVVVGAVGVGKSAL (SEQ ID NO:37) | MTEYKLVVVGAVGVGKSALT IQLIQ (SEQ ID NO:40) |
| **G13D** | VGAGDVGKS (SEQ ID NO:123) | MLVVVGAGDVGKSALT (SEQ ID NO:38) | MTEYKLVVVGAGDVGKSALT IQLIQ (SEQ ID NO:41) |
| **G12C** | VVGACGVGK (SEQ ID NO:124) | MKLVVVGACGVGKSA (SEQ ID NO:125) | MTEYKLVVVGACGVGKSALT IQLIQ (SEQ ID NO:72) |
| **ДТ** | | | MTEYKLVVVGAGGVGKSALT IQLIQ (SEQ ID NO:74) |

**Таблица 9: Аминокислотные последовательности мутантных KRAS**

| **МУТАНТ KRAS** | **АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ** |
|---|---|
| KRAS(G12D)15mer | MKLVVVGADGVGKSAL (SEQ ID NO:36) |
| KRAS(G12V)15mer | MKLVVVGAVGVGKSAL (SEQ ID NO:37) |
| KRAS(G13D)15mer | MLVVVGAGDVGKSALT (SEQ ID NO:38) |
| KRAS(G12D)25mer | MTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:39) |
| KRAS(G12V)25mer | MTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:40) |
| KRAS(G13D)25mer | MTEYKLVVVGAGDVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:41) |
| KRAS(G12D)15mer^ | MKLVVVGADGVGKSALKLVVVGADGVGKSALKLVVVGADGVGKSAL (SEQ ID NO:42) |

| | |
|---|---|
| 3 | |
| KRAS(G12V)15mer^3 | MKLVVVGAVGVGKSALKLVVVGAVGVGKSALKLVVVGAVGVGKSAL (SEQ ID NO:43) |
| KRAS(G13D)15mer^3 | MLVVVGAGDVGKSALTLVVVGAGDVGKSALTLVVVGAGDVGKSALT (SEQ ID NO:44) |
| KRAS(G12D)25mer^3 | MTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:45) |
| KRAS(G12V)25mer^3 | MTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:46) |
| KRAS(G13D)25mer^3 | MTEYKLVVVGAGDVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGAGDVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGAGDVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:47) |
| KRAS(G12C)25mer | MTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:72) |
| KRAS(G12C)25mer^3 | MTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:73) |
| KRAS(WT)25mer | MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:74) |

**Таблица 10: Последовательности мРНК мутантного антигена KRAS**

| **Название мРНК** | **Последовательность ОРС (аминокислотная)** | **Последовательность ОРС (нуклеотидная)** |
|---|---|---|
| KRAS (G12D) 25mer | MTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO: 39) | ATGACCGAGTACAAGCTGGTGGTGGTGGGCGCCGACGGCGTGGGCAAGAGCGCCCTGACCATCCAGCTGATCCAG (SEQ ID NO:126) |
| KRAS (G12V) 25mer | MTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO: 40) | ATGACCGAGTACAAGCTGGTGGTGGTGGGCGCCGTGGGCGTGGGCAAGAGCGCCCTGACCATCCAGCTGATCCAG (SEQ ID NO:127) |

| | | |
|---|---|---|
| KRAS (G13D) 25mer | MTEYKLVVVGAGDVGKSALTIQL IQ (SEQ ID NO: 41) | ATGACCGAGTACAAGCTGGTGGTGGTGG GCGCCGGCGACGTGGGCAAGAGCGCCCT GACCATCCAGCTGATCCAG (SEQ ID NO:128) |
| KRAS (G12D) 25mer^3 | MTEYKLVVVGADGVGKSALTIQL IQMTEYKLVVVGADGVGKSALTI QLIQMTEYKLVVVGADGVGKSAL TIQLIQ (SEQ ID NO: 45) | ATGACCGAGTACAAGTTAGTGGTTGTGG GCGCCGACGGCGTGGGCAAGAGCGCCCT CACCATCCAGCTTATCCAGATGACGGAA TATAAGTTAGTAGTAGTGGGAGCCGACG GTGTCGGCAAGTCCGCTTTGACCATTCA ACTTATTCAGATGACAGAGTATAAGCTG GTCGTTGTAGGCGCAGACGGCGTTGGAA AGTCGGCACTGACGATCCAGTTGATCCA G (SEQ ID NO:129) |
| KRAS (G12V) 25mer^3 | MTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQL IQMTEYKLVVVGAVGVGKSALTI QLIQMTEYKLVVVGAVGVGKSAL TIQLIQ (SEQ ID NO: 46) | ATGACCGAGTACAAGCTCGTCGTGGTGG GCGCCGTGGGCGTGGGCAAGAGCGCCCT AACCATCCAGTTGATCCAGATGACCGAA TATAAGCTCGTGGTAGTCGGAGCGGTGG GCGTTGGCAAGTCAGCGCTAACAATACA ACTAATCCAAATGACCGAATACAAGCTA GTTGTAGTCGGTGCCGTCGGCGTTGGAA AGTCAGCCCTTACAATTCAGCTCATTCA G (SEQ ID NO:130) |
| KRAS (G13D) 25mer^3 | MTEYKLVVVGAGDVGKSALTIQL IQMTEYKLVVVGAGDVGKSALTI QLIQMTEYKLVVVGAGDVGKSAL TIQLIQ (SEQ ID NO: 47) | ATGACCGAGTACAAGCTCGTAGTGGTTG GCGCCGGCGACGTGGGCAAGAGCGCCCT AACCATCCAGCTCATCCAGATGACAGAA TATAAGCTTGTGGTTGTGGGAGCAGGAG ACGTGGGAAAGAGTGCGTTGACGATTCA ACTCATACAGATGACCGAATACAAGTTG GTGGTGGTCGGCGCAGGTGACGTTGGTA AGTCTGCACTAACTATACAACTGATCCA G (SEQ ID NO:190) |
| KRAS (G12C) 25mer | MTEYKLVVVGACGVGKSALTIQL IQ (SEQ ID NO: 72) | ATGACCGAGTACAAGCTGGTGGTGGTGG GCGCCTGCGGCGTGGGCAAGAGCGCCCT GACCATCCAGCTGATCCAG (SEQ ID NO:132) |

| | | |
|---|---|---|
| KRAS (G12C) 25mer^3 | MTEYKLVVVGACGVGKSALTIQL IQMTEYKLVVVGACGVGKSALTI QLIQMTEYKLVVVGACGVGKSAL TIQLIQ (SEQ ID NO: 73) | ATGACCGAGTACAAGCTCGTGGTTGTTG GCGCCTGCGGCGTGGGCAAGAGCGCCCT CACCATCCAGCTCATCCAGATGACAGAG TATAAGTTAGTCGTTGTCGGAGCTTGCG GAGTTGGAAAGTCGGCGCTCACCATTCA ACTCATACAAATGACAGAATATAAGTTA GTGGTGGTGGGTGCGTGTGGCGTTGGCA AGAGTGCGCTTACTATCCAGCTCATTCA G (SEQ ID NO:184) |
| KRAS (WT) 25mer | MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQL IQ (SEQ ID NO: 74) | ATGACCGAGTACAAGCTGGTGGTGGTGG GCGCCGGCGGCGTGGGCAAGAGCGCCCT GACCATCCAGCTGATCCAG (SEQ ID NO:133) |

Химия: модифицированный уридинами N1-метилпсевдоуридин (m1Ψ)

Кэп: C1

Хвост: T100

Последовательность 5'-HTO (стандартное 5' фланкирование (включает синтез FP+сайт T7+5'-HTO)):
TCAAGCTTTTGGACCCTCGTACAGAAGCTAATACGACTCACTATAGGGAAATAAGAGAGAAAAG AAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACC (SEQ ID NO: 21)

Последовательность 5'-HTO (без промотора):
GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACC

(SEQ ID NO: 134)

Последовательность 3'-HTO (человеческая 3'-HTO без XbaI):
TGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCTTGGGCCTCCCCCCAGCCCCTCC TCCCCTTCCTGCACCCGTACCCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC (SEQ ID NO: 22)

В первом исследовании, посвященном изучению влияния конструкта иммуностимуляторной мРНК STING на антигенные ответы KRAS in vivo, мышам HLA-A*2:01 Tg (Taconic, штамм 9659F, n=4) вводят мРНК, кодирующую различные формы мутированных пептидных антигенов KRAS, следующим образом: мРНК, кодирующую мутированный KRAS (отдельно или в комбинации со STING), вводят на 1-е сутки, отбор крови на 8-е сутки, мРНК, кодирующую мутированный KRAS (отдельно или в комбинации со STING), вводят на 15-е сутки, животное, умерщвляют на 22-е сутки. Исследуемые группы приведены в Таблице 11 следующим образом:

Таблица 11

| Исследуемая группа | Группа | Тестовый/ контрольный материал | Иммуно-стимулятор | Носитель | Способ введения | Схема применения |
|---|---|---|---|---|---|---|
| KRAS-MUT | 1 | KRAS G12D | (NTFIX) отсутствует | Соединение 25 | ВМ | 1-е, 15-е сутки |
| | 2 | KRAS G12V | (NTFIX) отсутствует | Соединение 25 | ВМ | 1-е, 15-е сутки |
| | 3 | KRAS G13D | (NTFIX) отсутствует | Соединение 25 | ВМ | 1-е, 15-е сутки |
| | 4 | KRAS G12C | (NTFIX) отсутствует | Соединение 25 | ВМ | 1-е, 15-е сутки |
| KRAS-MUT+ STING | 5 | KRAS G12D | STING (V155M) | Соединение 25 | ВМ | 1-е, 15-е сутки |
| | 6 | KRAS G12V | STING (V155M) | Соединение 25 | ВМ | 1-е, 15-е сутки |
| | 7 | KRAS G13D | STING (V155M) | Соединение 25 | ВМ | 1-е, 15-е сутки |
| | 8 | KRAS G12C | STING (V155M) | Соединение 25 | ВМ | 1-е, 15-е сутки |
| Без Аг | 9 | NTFIX | NTFIX | Соединение 25 | ВМ | 1-е, 15-е сутки |
| Только STING | 10 | NTFIX | STING V155M) | Соединение 25 | ВМ | 1-е, 15-е сутки |

мРНК вводят животным в дозе 0,5 мг/кг (10 мкг на 20 г массы животного). Конструкты KRAS и STING вводят в соотношении 1:1. Повторную стимуляцию ex vivo (2 мкг/мл на пептид) тестируют в течение 4 часов при 37 градусах Цельсия в присутствии GolgiPlug (брефельдин А). Внутриклеточное окрашивание цитокинов (ICS) тестируют на KRAS G12D, KRAS G12V, KRAS G13D, KRAS ДТ, и в отсутствии пептида.

мРНК, кодирующую мутации KRAS, отдельно или в комбинации с мРНК, кодирующей конститутивно активный STING, тестируют на способность к выработке Т-клеток. Эффективность мРНК, кодирующей мутации KRAS, сравнивают, например, с пептидной вакцинацией. Эффект иммуностимулятора STING определяется путем сравнения лечения только с использованием мутантных пептидов KRAS в комбинации с иммуностимулятором STING. Например, ответы в

отношении CD8 вакцины могут оцениваться путем внутриклеточного окрашивания (ICS) для ИФН-γ и/или ФНО-α, как описано в данном документе. Усиленные ответы ICS для ИФН-γ и/или ФНО-α у мышей, получавших вакцину на основе мутантного пептида KRAS в комбинации с конструктами иммуностимуляторной мРНК STING, по сравнению с лечением одним только конструктом мРНК-вакцины на основе мутантного пептида KRAS, указывает на то, что иммуностимулятор STING усиливает KRAS-специфические ответы в отношении CD8 вакцины.

Во втором исследовании, посвященном изучению влияния конструкта иммуностимуляторной мРНК STING на иммунные ответы в отношении различных форм конструктов мРНК мутантного пептидного антигена KRAS, мышам HLA*A*11:01 Tg (Taconic, штамм 9660F, n=4) вводят мРНК, кодирующую различные формы мРНК мутантного пептидного антигена KRAS, в комбинации с конструктом иммуностимуляторного мРНК STING следующим образом: мРНК, кодирующую мутированный KRAS в комбинации со STING, вводят на 1-е сутки, отбор крови на 8-е сутки, мРНК, кодирующую мутированный KRAS, в комбинации со STING вводят на 15-е сутки, животное умерщвляют на 22-е сутки.

Типы тестируемых мутантных конструктов KRAS были следующими: (i) мРНК, кодирующая одиночный мутантный пептидный антиген KRAS 25mer, содержащий или мутацию G12D, G12V, G13D или G12C («синглет»); (ii) мРНК, кодирующая конкатемер из трех 25-мерных пептидных антигенов (таким образом, образующих 75-мерный), каждый из которых содержит мутации G12D, G12V и G13D («KRAS-3MUT»); (iii) мРНК, кодирующая конкатемер из четырех 25-мерных пептидных антигенов (таким образом, образующих 100-мерный), каждый из которых содержит мутации G12D, G12V, G13D и G12C («KRAS-4MUT»); или (iv) четыре отдельные мРНК, вводимые совместно, каждая из которых кодирует один мутантный пептидный антиген KRAS 25mer, содержащий мутацию G12D, G12V, G13D или G12C («Single x 4»).

Аминокислотные и нуклеотидные последовательности G12D 25mer приведены в SEQ ID NO: 39 и 126, соответственно. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности G12V 25mer приведены в SEQ ID NO: 40 и 127, соответственно. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности G13D 25mer приведены в SEQ ID NO: 41 и 128, соответственно. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности G12C 25mer приведены в SEQ ID NO: 72 и 132, соответственно.

Аминокислотные и нуклеотидные последовательности KRAS-3MUT 75mer приведены в SEQ ID NO: 135 и 136, соответственно. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности KRAS-4MUT 100mer приведены в SEQ ID NO: 137 и 138, соответственно.

Исследуемые группы приведены в Таблице 12 следующим образом:

**Таблица 12**

| **Исследуемая группа** | **Группа** | **Тестовый/ контрольный материал** | **Иммуно-Стимулятор** | **Носитель** | **Способ введения** | **Схема применения** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| KRAS-MUT Синглет | 1 | KRAS G12D | STING (V155M) | Соединение 25 | ВМ | 1-е, 15-е сутки |
| | 2 | KRAS G12V | STING (V155M) | Соединение 25 | ВМ | 1-е, 15-е сутки |
| | 3 | KRAS G13D | STING (V155M) | Соединение 25 | ВМ | 1-е, 15-е сутки |
| | 4 | KRAS G12C | STING (V155M) | Соединение 25 | ВМ | 1-е, 15-е сутки |
| KRAS-MUT Конкатемер | 5 | KRAS-3MUT | STING (V155M) | Соединение 25 | ВМ | 1-е, 15-е сутки |
| | 6 | KRAS-4MUT | STING (V155M) | Соединение 25 | ВМ | 1-е, 15-е сутки |
| Single X 4 | 7 | G12D+G12V+ G12C+G13D | STING (V155M) | Соединение 25 | ВМ | 1-е, 15-е сутки |
| Только STING | 8 | NTFIX | STING (V155M) | Соединение 25 | ВМ | 1-е, 15-е сутки |

мРНК вводят животным в дозе 0,5 мг/кг (10 мкг на 20 г массы животного). Конструкты KRAS и STING вводят в соотношении 5: 1.

Повторную стимуляцию ex vivo (2 мкг/мл на пептид) выполняют в течение 5 часов при 37 градусах Цельсия в присутствии GolgiPlug (брефельдин A). Внутриклеточное окрашивание цитокинов (ICS) тестируют на KRAS G12D, KRAS G12V, KRAS G13D, G12C, KRAS ДТ, и в отсутствии пептида.

Тестируется способность различных мРНК, кодирующих мутации KRAS в комбинации с мРНК, кодирующей конститутивно активный STING, генерировать ответы Т-клеток, чтобы можно было сравнить влияние иммуностимулятора STING на различные отличающиеся конструкты KRAS. Например, ответы в отношении CD8 вакцины могут оцениваться путем внутриклеточного окрашивания (ICS) для ИФН-γ и/или ФНО-α, как описано в данном документе.

**Пример 8: Иммуностимуляторные мРНК усиливают ответы в отношении вакцины против HPV**

В данном примере была исследована эффективность и длительность ответов на вакцину на основе мРНК E6/E7 вируса папилломы человека (HPV), используемую в комбинации с иммуностимуляторами STING, IRF3 или IRF7. Известно, что специфический иммунный ответ на вирус папилломы человека (HPV) в микроокружении шейки матки играет ключевую роль в эрадикации инфекции и уничтожении мутированных клеток. Однако известно, что HPV высокого риска модулируют иммунные клетки для создания иммуносупрессивного микроокружения (см., например, Prata, T.T. et al. (2015) *Immunology* 146:113-121). Таким образом, подход к вакцинации против HPV, который приводит к устойчивому и длительному иммунному ответу, крайне желателен.

Вакцины против HPV, использованные в этом примере, представляли собой конструкты мРНК, кодирующие или внутриклеточные, или растворимые формы антигенов HPV 16 E6 и E7, обозначенные в данном документе как iE6/E7 и sE6/E7, соответственно. Для создания растворимого формата сигнальный пептид, необходимый для секреции, был слит с N-концом антигена. Последовательность сигнального пептида была получена из V-III области HAH каппа-цепи Ig. Мышей иммунизировали внутримышечно вакциной на основе мРНК iE6/E7 или sE6/E7 (в дозе 0,25 мг/кг) на 0-е и 14-е сутки в комбинации с контрольным конструктом мРНК (NTFIX) или конструктом иммуностимуляторной мРНК STING, IRF3 или IRF7 (в дозе 0,25 мг/кг). Конститутивно активный иммуностимулятор STING содержал мутацию V155M (мышиный вариант, соответствующий SEQ ID NO: 1). Конститутивно активный

иммуностимулятор IRF3 содержал мутацию S396D (соответствующий SEQ ID NO: 12). Конститутивно активный иммуностимулятор IRF7 содержал внутреннюю делецию и шесть точечных мутаций (мышиный вариант, соответствующий SEQ ID NO: 18). Конструкт вакцины против HPV и иммуностимуляторный конструкт совместно составляли в липидные наночастицы MC3.

На 21-е и 53-е сутки клетки селезенки и мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) от мышей в каждой тестируемой группе повторно стимулировали ex vivo в течение 4 часов при 37 градусах C в присутствии GolgiPlug™ (содержащего брефельдин A; BD Biosciences) или пулом пептидов E6 (содержащим 37 пептидов E6, последовательности которых приведены в SEQ ID NO: 36-72), пулом пептидов E7 (содержащим 22 пептида E7, последовательности которых приведены в SEQ ID NO: 73-94), одиночным пептидом E6 (8 отдельных пептидов), одиночным пептидом E7 (7 отдельных пептидов) или в отсутствии пептидов (контроль). Ответы на CD8 вакцины оценивали путем внутриклеточного окрашивания (ICS) на ИФН-γ или ФНО-α.

Репрезентативные результаты ICS для E7-специфических ответов клеток селезенки на 21-е сутки в отношении ИФН-γ и ФНО-α приведены на **Фиг. 11A** (ИФН-γ) и **Фиг. 11B** (ФНО-α). Репрезентативные результаты ICS для E6-специфических ответов клеток селезенки на 21-е сутки в отношении ИФН-γ и ФНО-α приведены на **Фиг. 12A** (ИФН-γ) и **Фиг. 12B** (ФНО-α). Результаты на **Фиг. 11A-11B и 12A-12B** демонстрируют, что ответы на CD8 вакцины (как на внутриклеточный, так и на растворимый антигенный формат) были значительно усилены, когда иммуностимуляторы STING, IRF3 или IRF7 были совместно составлены с вакциной, причем эпитоп E7 был сильнее и менее вариабельным, чем эпитоп E6, а растворимая форма антигена сильнее, чем внутриклеточная форма антигена. Было показано, что эти усиленные ответы на CD8 вакцины при помощи иммуностимуляторов являются длительными, о чем свидетельствуют репрезентативные данные ICS в отношении ИФН-γ клеток селезенки на 21-е сутки в сравнении с E7-специфическими клетками селезенки на 53-е сутки, приведенные на **Фиг. 13A и 13B**, соответственно. Результаты, аналогичные данным о клетках селезенки, наблюдались в экспериментах с МКПК (данные не показаны).

Также был исследован процент $CD8b^+$ клеток среди живых $CD45^+$ клеток. Результаты 21-х суток по сравнению с 53-ми сутками для клеток селезенки приведены на **Фиг. 14A и 14B**, соответственно.

Результаты демонстрируют, что иммуностимуляторы (в частности, конструкт STING) увеличивают общую популяцию $CD8b^+$ на 21-е сутки, но не на 53-и сутки.

Способность иммунностимуляторных конструктов усиливать ответ на CD8 вакцину была дополнительно подтверждена окрашиванием E7-MHC1-тетрамером. Репрезентативные результаты для клеток селезенки на 21-е и 53-и приведены на **Фиг. 15A и 15B**, соответственно. Результаты окрашивания E7-MHC-1-тетрамером соответствовали результатам ICS, рассмотренным выше, хотя они были более вариабельными. Как продемонстрировано на **Фиг. 16A-16D**, было обнаружено, что большинство тетрамер-положительных клеток CD8 имеют фенотип эффекторных $CD62L^{lo}$ клеток памяти. Сравнение 21-х суток и 53-х суток для E7-тетрамер$^+$ CD8 клеток показало, что данный фенотип эффекторных $CD62L^{lo}$ клеток памяти сохранялся на протяжении всего исследования. Дополнительные эксперименты с окрашиванием продемонстрировали, что иммуностимуляторы немного снижали % всех $Foxp3^+$ Treg CD4 T-клеток (данные не показаны) и не изменяли % $CD138^+$ плазмобластов (данные не показаны).

**Пример 9: Профилактическая или терапевтическая вакцинация вакциной против HPV в комбинации с иммуностимулятором STING ингибирует рост опухоли**

В данном примере мышей лечили вакциной против HPV в комбинации с иммуностимулятором STING до, одновременно или после заражения опухолевыми клетками TC1. TC-1 представляет собой мышиную модель опухоли, экспрессирующую E7 HPV16, известную в данной области техники (см., например, Bartkowiak et al. (2015) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112:E5290-5299). Вакцины против HPV, использованные в этом примере, представляли собой конструкты мРНК, кодирующие или внутриклеточные, или растворимые формы антигенов HPV 16 E6 и E7, обозначенные в данном документе как iE6/E7 и sE6/E7, соответственно, как описано в Примере 8. Конститутивно активный иммуностимулятор STING, используемый в этом примере, содержал мутацию V155M, как описано в Примере 8. Конструкт вакцины против HPV и иммуностимуляторный конструкт совместно составляли в липидные наночастицы MC3. Некоторых мышей также лечили ингибитором иммунной контрольной точки (или анти-CTLA-4, или анти-PD-1).

В первой серии экспериментов по изучению профилактической активности вакцинации HPV+STING мышей C57/ B6 лечили путем

внутримышечной инъекции 0,5 мг/кг вакцины HPV+STING (кодирующей или sE6/E7, или iE6/E7) на (i) −7-е и −14-е сутки или (ii) 1-е и 8-е сутки с последующей подкожной инъекцией 2 × $10^5$ клеток TC1 на 1-е сутки. Некоторых мышей также лечили на 6-е, 9-е и 12-е сутки или анти-CTLA-4, или анти-PD-1. Репрезентативные результаты, представленные как объем опухоли в зависимости от времени, представлены на графиках **Фиг. 17A–17C**, причем на **Фиг. 17A и 17B** приведены данные для мышей, получавших лечение на −14-е и −7-е сутки или sE6/E7 (**Фиг. 17A**) или iE6/E7 (**Фиг. 17B**) и на **Фиг. 17C** приведены данные для мышей, получавших лечение на 1-е и 8-е сутки sE6/E7. Результаты демонстрируют, что у всех мышей, получавших лечение вакциной HPV+STING (отдельно или в комбинации с ингибиторами иммунной контрольной точки), наблюдалось полное ингибирование роста опухоли в течение нескольких недель по сравнению с контрольными мышами (получавшими лечение контрольным конструктом мРНК NTFIX, отдельно или в комбинации с ингибитором иммунной контрольной точки). Таким образом, эти эксперименты демонстрируют, что профилактическая вакцинация (т.е. до или одновременно с заражением опухолью) вакциной против HPV вместе с иммуностимулятором STING эффективна для предотвращения роста опухолевых клеток, экспрессирующих HPV, in vivo.

Во второй серии экспериментов по изучению терапевтической активности вакцинации HPV+STING мышам C57/B6 вводили 2 × $10^5$ клеток TC1 подкожно на 1-е сутки с последующей внутримышечной инъекцией 0,5 мг/кг вакцины HPV+STING (кодирующая sE6/E7) на 8-е и 15-е сутки. Некоторых мышей также лечили на 13-е, 16-е и 19-е сутки или анти-CTLA-4, или анти-PD-1. Репрезентативные результаты, представленные как объем опухоли в зависимости от времени, представлены на графиках **Фиг. 18A–18I.** Результаты демонстрируют, что у мышей, получавших лечение вакциной HPV+STING (отдельно или в комбинации с ингибиторами иммунной контрольной точки), наблюдалась регрессия опухоли (**Фиг. 18A–18C**), по сравнению с контрольными мышами, получавшими лечение контрольным конструктом мРНК NTFIX, отдельно или в комбинации с ингибитором иммунной контрольной точки (**Фиг. 18D–18F**) или контрольными мышами, получавшими лечение конструктом sE6/E7 в комбинации с контрольным конструктом DMXAA, отдельно или в комбинации с ингибитором иммунной контрольной точки (**Фиг. 18G–18I**). Таким образом, эти эксперименты демонстрируют, что терапевтическая вакцинация (т.е. после заражения опухолью)

вакциной против HPV вместе с иммуностимулятором STING эффективна в индукции регрессии опухолей, экспрессирующих HPV, *in vivo*.

**Пример 10. Определение оптимального массового соотношения антиген: иммуностимулятор при разработке мРНК-вакцины**

В данном примере исследования проводились на животных, которых лечили представляющим интерес антигеном (Аг) в комбинации с иммуностимулятором при различных соотношениях Аг: иммуностимулятор, с последующей оценкой ответов Т-клеток на антиген для определения оптимальных соотношений Аг: иммунностимулятор в усилении иммунного ответа на представляющий интерес антиген.

В первой серии экспериментов мышей лечили вакциной MC38, кодирующей конкатемер ADR трех 25-мерных мутантных пептидов, содержащих опухолевые неоэпитопы, полученные из Adpgk, Dpagt1 и Reps1 (данная вакцина также упоминается в данном документе как ADRvax), как описано в Примере 5, в комбинации с конститутивно активным иммуностимуляторным конструктом STING. Конститутивно активный иммуностимулятор STING, используемый в этом примере, содержал мутацию V155M, как описано в Примере 1. Конструкты ADRvax и STING были совместно составлены в липидную наночастицу (содержащую соединение 25 (Cmp25)) при различных соотношениях Аг:STING, согласно дизайну исследования, обобщенному ниже в Таблице 13.

**Таблица 13**

| **Группа** | **Аг:STING Соотношение** | **Доза Аг (мкг)** | **Доза STING (мкг)** | **NTFIX (мкг)** | **Суммарная мРНК (мкг)** | **Носитель** | **Способ введения** | **Схема применения** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Без Аг контроль | 0 | 3 | 3 | 6 | Cmp25 | ВМ | 1-е, 15-е сутки |
| 2 | 1: 1 | 3 | 3 | 0 | | | | |
| 3 | 5:1 | | 0,6 | 2,4 | | | | |
| 4 | 10:1 | | 0,3 | 2,7 | | | | |
| 5 | 20:1 | | 0,15 | 2,85 | | | | |
| 6 | 1:0 (без STING) | | 0 | 3 | | | | |
| 7 | 1: 1 | 5 | 5 | 0 | 10 | | | |
| 8 | 1: 0 (без STING) | | 0 | 5 | | | | |

Мышам вводили внутримышечно на 1-е и 15-е сутки. На 21-е сутки $CD8^+$ клетки селезенки мышей в каждой тестируемой группе повторно стимулировали ex vivo в течение 4 часов при 37 градусах С в присутствии GolgiPlug™ (содержащего брефельдин А; BD Biosciences) с пептидами ADR дикого типа или мутантными MC38 (1 мкг/мл на пептид, объединенные) и ответы на CD8 вакцины оценивали путем внутриклеточного окрашивания (ICS) для ИФН-γ или ФНО-α. Репрезентативные результаты ICS для ADR-специфических ответов MC38 по $CD8^+$ клеткам селезенки на 21-е сутки для ИФН-γ показаны на **Фиг. 19** и для ФНО-α показаны на **Фиг. 20.** Кроме того, ответы в отношении CD8 вакцины на каждый из трех отдельных эпитопов в ADRvax (то есть пептиды Adpk1, Reps1 и Dpagt1) также оценивали посредством ICS для ИФН-γ после стимуляции отдельными эпитопами. Результаты показаны на **Фиг. 21A** (для пептида Adpk1), **Фиг. 21B** (для пептида Reps1) и **Фиг. 21C** (для пептида Dpagt1).

Результаты демонстрируют, что все тестируемые соотношения Аг:STING (в диапазоне от 1:1 до 20:1) проявляли адъювантный эффект STING по сравнению с контролем. Для антигена ADRvax в целом было установлено, что оптимальное соотношение Аг:STING составляет 5:1. Для отдельных пептидных эпитопов в ADRvax оптимальное соотношение Аг:STING для пептида Adpgk1 составляло 5:1, тогда как оптимальное соотношение Аг:STING для пептида Reps1 составляло 10:1 (ответы на третий пептид, Dpagt1, были очень низкими с или без STING, что соответствует недоминантному эпитопу, как было известно в данной области техники). Было также обнаружено, что STING увеличивает общий процент CD8+ клеток среди CD45+ Т-клеток, при этом наблюдаются ответы на дозы (данные не показаны), и было обнаружено, что он увеличивает общий процент CD62L клеток среди CD44hi CD8+ клеток (подмножество эффекторных клеток памяти) с наблюдаемыми ответами на дозы (данные не приведены). Кроме того, результаты, полученные на клетках МПКП, соответствовали результатам на клетках селезенки (данные не приведены). Таким образом, эти эксперименты подтвердили способность STING действовать в качестве иммуностимулятора в усилении иммунных ответов против антигена ADRvax и, кроме того, продемонстрировали определение оптимального соотношения Аг: иммуностимулятор для лечения, в соотношениях, которые рассматриваются как наиболее оптимальные, отличные от 1:1 (например, соотношения 5:1 или 10:1 более эффективны, чем 1:1). Результаты также демонстрируют, что

оптимальное соотношение Аг: иммуностимулятор может отличаться в зависимости от конкретного используемого представляющего интерес антигена.

Во второй серии экспериментов приматов, отличных от человека, лечили вакциной против HPV, кодирующей внутриклеточный E6/E7 (iE6/E7), как описано в Примере 8, в комбинации с конститутивно активным конструктом иммуностимулятора STING в различных соотношениях Аг: STING (липидные наночастицы, содержащие Соединение 25), в соответствии с дизайном исследования, приведенным ниже в Таблице 14:

**Таблица 14**

| **Группа** | **Лечение** | **Аг:STING Соотношение** | мкг **Аг** | мкг **STING** | мкг **NTFIX** | **n** | **Общая доза Аг** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Только STING | – | – | 100 | – | 3 | 100 мкг |
| 2 | Аг:STING | 1: 1 | 50 | 50 | – | | |
| 3 | Аг:STING | 5:1 | 83,33 | 16,67 | – | | |
| 4 | Аг:STING | 10:1 | 90,9 | 9,09 | | | |
| 5 | Только Аг | – | 90 | – | 10 | | |

Никаких клинических результатов не наблюдалось по прошествии 24-х суток после первой дозы (вводимой внутримышечно), что указывает на отсутствие реакций в месте инъекции и на то, что начальное лечение было получено безопасно. После начальной дозы на 1-е сутки животные получают двухнедельный период восстановления, а затем получают вторую дозу на 14-е сутки, после чего следует еще один двухнедельный период восстановления. Дальнейший анализ безопасности определяется по клинической патологии (клиническая биохимия, гематология и коагуляция) на 2-е, 16-е и 30-е сутки. Анализ антиантител и ELISpot или ICS в отношении ИФН-γ и CD4 и CD8 клеток проводят для оценки усиления иммунных ответов на вакцину против HPV с помощью STING при различных тестируемых соотношениях.

В третьей серии экспериментов модельный конкатемерный антиген с использованием известных мышиных эпитопов был протестирован на мышах в комбинации с конститутивно активным иммуностимулятором STING в различных соотношениях. Конкатемерный антиген, называемый в данном документе CA-132, содержит 20

известных мышиных эпитопов, которые, как считается, представлены антигенами ГКГС класса I и класса II мыши CB6. Эти эпитопы были получены с веб-сайта IEDB.org, общедоступной базы данных эпитопов, полученной из литературы. Ожидается, что эпитопы класса I будут представлены на молекулах ГКГС класса I и будут вызывать ответ CD8+, в то время как эпитопы класса II должны быть представлены на молекулах ГКГС класса II и запускать ответы CD4+ Т-клеток. Конструкт антигена CA-132 кодирует эпитопы класса I и класса II, что позволяет оценивать ответы CD4 и CD8 Т-клеток. Более того, считается, что включение эпитопов класса II в конкатемерный антиген (таким образом запуская ответ CD4) помогает индуцировать более сильный ответ CD8 Т-клеток. Таким образом, подход к конструированию антигена CA-132 также может быть использован при конструировании других конструктов конкатемерных антигенов

Конструкт антигена CA-132 и конструкт иммуностимулятора STING совместно составляли в липидных наночастицах, содержащих соединение 25, и вводили мышам CB6 внутримышечно в следующих дозах: CA-132 только по 1 мкг, 3 мкг или 10 мкг, STING отдельно по 3 мкг, CA-132+STING по 3 мкг каждый или 1 мкг каждый (соотношение 1:1), CA-132 по 3 мкг и STING по 1 мкг (соотношение Аг:STING 3:1) или CA-132 по 1 мкг и STING по 3 мкг (соотношение Аг:STING 1:3). Антигенспецифические Т-клеточные ответы на эпитопы класса I в конструкте антигена CA-132 исследовали с помощью анализа ELISpot на ИФН-γ, результаты которого показаны на **Фиг. 22.** Результаты продемонстрировали увеличение ответов ИФН-γ на эпитопы класса I при введении в состав STING.

В четвертой серии экспериментов модель вакцины против ВПЧ, описанную в Примере 8, использовали для изучения влияния различных соотношений антигена E6/E7 к конститутивно активному иммуностимулятору STING. Мышей иммунизировали внутримышечно вакциной на основе мРНК iE6/E7 (3 мкг или 5 мкг) в комбинации с конститутивно активным конструктом иммуностимуляторной мРНК STING V155M в соотношениях Аг: STING 1: 1, 5: 1, 10: 1, 20: 1 или 0,4: 1. Конструкт вакцины против HPV и иммуностимуляторный конструкт совместно составляли в липидные наночастицы MC3. В качестве контролей использовали вакцину против HPV или STING в комбинации только с контрольной мРНК (NTFIX).

На 21-е сутки клетки селезенки от мышей в каждой тестируемой группе повторно стимулировали ex vivo в течение 4

часов при 37°C в присутствии GolgiPlug ™ (содержащего брефельдин A; BD Biosciences) с пулом пептидов E7 (описанным в Примере 8). Ответы на CD8 вакцины оценивали путем внутриклеточного окрашивания (ICS) на ИФН-γ. Результаты показаны на **Фиг. 23A.** Результаты демонстрируют, что STING усиливает антигенспецифические Т-клеточные ответы при всех протестированных соотношениях Аг:STING. Наибольшее усиление наблюдали у мышей, получавших более высокую дозу антигена (5 мкг) в соотношении 1: 1 со STING, и у мышей, получавших лечение в соотношении Аг: STING 0,4: 1 (от 3 мкг Аг до 7 мкг STING).

Способность STING усиливать ответ на CD8 вакцину в модели HPV при различных протестированных соотношениях Аг: STING была дополнительно подтверждена окрашиванием H2-Kb/пептидом E7-тетрамером. Репрезентативные результаты для клеток селезенки на 21-е сутки приведены на **Фиг. 23B.** Результаты окрашивания E7-MHC-1-тетрамером соответствовали результатам ICS, рассмотренным выше, хотя они были более вариабельными.

Таким образом, эти исследования подтвердили способность конструкта иммуностимулятора STING усиливать иммунные ответы на представляющий интерес антиген и продемонстрировали определение оптимальных соотношений Аг:STING для лечения.

**Пример 11: Иммуностимулирование при помощи STING у приматов, отличных от человека**

В данном примере приматов, отличных от человека (яванских макак), лечили мРНК, кодирующей вакцину против HPV, в комбинации с иммуностимулятором STING с последующим оцениванием антигенспецифического Т-клеточного ответа и гуморального иммунного ответа. Конструкт вакцины против HPV, использованный в данном примере, описан в Примере 8. Конструкт конститутивно активного иммуностимулятора STING, используемый в данном примере, содержал мутацию V155M, как описано в Примере 8. Конструкт вакцины против HPV и конструкт иммуностимуляторной мРНК были совместно составлены в липидные наночастицы, содержащие: соединение 25: холестерин: DSPC: ПЭГ-DMG в соотношениях 50: 38,5: 10: 1,5, соответственно. Были испытаны различные соотношения STING:Аг. Контрольных животных лечили мРНК, кодирующими или только антигены HPV, или только иммуностимулятор STING.

Пятнадцать самцов яванских макак в возрасте 2-5 лет и массой 2-5 кг получали лечение в соответствии с дизайном

исследования, приведенным ниже в Таблице 15:

**Таблица 15**

| Группа | Опис. | Соотношение | Суммарная мРНК (мкг) | NTFIX | STING (мкг) | Аг HPV (мкг) | n |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Только Аг | | 100 | 10 | | 90 | 3 |
| 2 | Только STING | | 100 | | 100 | 0 | 3 |
| 3 | STING:Аг | 1: 1 | 100 | | 50 | 50 | 3 |
| 4 | STING:Аг | 1:5 | 100 | | 17 | 83 | 3 |
| 5 | STING:Аг | 1:10 | 100 | | 9 | 91 | 3 |

Образец МКПК отбирали за 4 суток до введения с последующим внутримышечным введением LNP с мРНК животным на 1-е сутки и 15-е сутки. Образец МКПК отбирали на 29-е сутки после введения. В ходе исследования не было отмечено токсичности или других серьезных клинических проявлений, что свидетельствует о хорошей переносимости LNP с мРНК.

Для изучения способности иммуностимулятора STING усиливать антигенспецифические ответы CD8+ Т-клеток проводили внутриклеточное окрашивание цитокинов (ICS) в отношении ФНО-α и ИЛ-2. МКПК стимулировали ex vivo с помощью пула пептидов E6 HPV16 или пула пептидов E7 HPV16 в течение 6 часов при 37 °C. Стимуляцию PMA/иономицином использовали в качестве положительного контроля, а стимуляцию только средой использовали в качестве отрицательного контроля.

Репрезентативные результаты для ICS на ФНО-α представлены на **Фиг. 24A-24C**, причем на **Фиг. 24A** продемонстрированы результаты для стимуляции ex vivo пулом пептидов E6, на **Фиг. 24B** продемонстрированы результаты для стимуляции ex vivo пулом пептидов E7, а на **Фиг. 24C** продемонстрированы результаты для стимуляции ex vivo контролем со средой. Между группой до и после введения дозы, иммунизированной одним антигеном (Группа 1) не наблюдалось никакого увеличения количества ФНО-α+ CD8 Т-клеток. Иммунизация с применением только одного STING (группа 2) имела незначительное влияние на количество ФНО-α+ CD8 Т-клеток. Напротив, группы, иммунизированные STING+Аг (группы 3, 4, 5), продемонстрировали значительное увеличение антигенспецифических

ФНО-α+ CD8 Т-клеток. Кроме того, группа 5, которая была иммунизирована «совпадающей» дозой антигена STING:Аг (соотношение 1:10), продемонстрировала значительное увеличение антигенспецифических ФНО-α+ CD8 Т-клеток по сравнению с контролями группы 1 и группы 2.

Репрезентативные результаты для ICS на ИЛ-2 представлены на **Фиг. 25A-25C**, причем на **Фиг. 25A** продемонстрированы результаты для стимуляции ex vivo пулом пептидов E6, на **Фиг. 25B** продемонстрированы результаты для стимуляции ex vivo пулом пептидов E7, а на **Фиг. 25C** продемонстрированы результаты для стимуляции ex vivo контролем со средой. У всех иммунизированных животных наблюдалось умеренное увеличение частоты встречаемости ИЛ-2+ CD8 Т-клеток между дозами до и после введения (группы 1-5). Однако увеличение ИЛ-2+ CD8 Т-клеток было наиболее детектируемым в группах, получавших STING:Аг в соотношениях 1:1 и 1:5 (группы 3 и 4), тогда как животные, получавшие STING:Аг в соотношении 1:10 не продемонстрировало увеличение ИЛ-2+ CD8 Т-клеток по сравнению с контролем. Увеличение ИЛ-2 согласуется с известной способностью субпопуляций Т-клеток секретировать ИЛ-2 во время активных Т-клеточных ответов.

Для исследования влияния лечения STING:Аг на NHP (приматов, отличных от человека) на образование антигенспецифических антител, проводили E6-специфический и E7-специфический ИФА. Планшеты покрывали или рекомбинантным E6 (Prospec; № HPV-005 His HPV16 E6), или рекомбинантным E7 (ProteinX; № 2003207 His HPV16 E7). В качестве положительного контроля использовали мышиное анти-E6 моноклональное антитело от Alpha Diagnostics International (№ HPV16E6 1-M). В качестве положительного контроля использовали мышиное анти-E7 моноклональное антитело от Fisher/Life Technologies (№ 280006-EA). Антитело против мышиного IgG-HRP от Jackson ImmunoResearch (№ 715-035-150) использовали в качестве вторичного антитела для положительного контроля. В качестве вторичного антитела для сыворотки NHP использовали антитело против обезьяньего IgG-HRP от Abcam (№ ab112767).

Планшеты покрывали рекомбинантным E6 или E7 (500 нг/лунку; 100 мкл/лунку) при 4 °C в течение ночи и затем блокировали с использованием TBS SuperBlock в течение 1 часа при комнатной температуре. Первичное антитело добавляли (100 мкл/лунку) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Положительные контрольные антитела серийно разводили. Сыворотку

NHP разбавляли 1:5000. После промывки добавляли вторичное антитело (100 мкл/лунку) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Положительный контроль антитела против мышиного IgG-HRP разводили 1:5000. Для сывороток NHP антитело против обезьяньего IgG-HRP разбавляли 1:30000. Цвет проявлялся в течение 5 минут (анти-E6) или в течение 10 минут (анти-E7), затем останавливали и считывали при 450 нм.

Репрезентативные результаты для IgG против E6 HPV16 приведены на **Фиг. 26.** Репрезентативные результаты для IgG против E7 HPV16 приведены на **Фиг. 27.** Результаты как для анти-E6, так и для анти-E7 демонстрируют, что лечение животных STING:Ag, особенно, в соотношениях 1:5 и 1:10, приводила к усилению образования антигенспецифических антител.

Для дальнейшего исследования антигенспецифического ответа IgG были проведены дополнительные исследования при помощи ИФА с использованием серий двукратных разведений сывороток на 25-е сутки. Как показано на **Фиг. 28,** серии двукратных разведений для животных, получавших лечение в соотношении STING: Ag 1:10, демонстрировали явное увеличение уровней анти-HPV16 E6-специфических антител IgG по сравнению с животными, получавшими только вакцину против HPV. Рассчитанные значения титра из этих исследований при помощи ИФА с серий двукратных разведений сыворотки на 25-е сутки для анти-E6 IgG и анти-E7 IgG приведены на **Фиг. 29A** и **29B,** соответственно. Рассчитанные значения титра, особенно для анти-E6-специфического ответа, подтверждают усиление иммуностимулятором STING, причем соотношение STING: Ag 1:10 демонстрирует наибольшее усиление.

Соответственно, результаты, описанные в данном документе, для исследования приматов, отличных от человека, подтверждают, что STING иммуностимулирует антигенспецифические ответы T-клеток и продукцию антител против антигена мРНК-вакцины in vivo.

**Пример 12: Иммуногенность различных форматов вакцин KRAS-STING у трансгенных мышей HLA*A11**

В данном примере, для изучения влияния конструктов мРНК иммуностимулятора STING на иммунные ответы в отношении различных форм мутантных конструктов мРНК пептидного антигена KRAS, мышам HLA*A*11:01 Tg (Taconic, штамм 9660F, n=3) вводили мРНК, кодирующую различные формы мутантных конструктов мРНК пептидного антигена KRAS, в комбинации с конструктами иммуностимуляторной мРНК STING, следующим образом: мРНК, кодирующую мутантный KRAS в

комбинации со STING, вводили на 0-е и 14-е сутки, животных умерщвляли на 21-е сутки. Мыши были в возрасте 6-9 недель на 0-е сутки. мРНК вводили животным в дозе 0,5 мг/кг (10 мкг на 20 г веса животного). Конструкты KRAS и STING вводят в соотношении 5:1 (Аг:STING).

Типы тестируемых мутантных конструктов KRAS были следующими: (i) мРНК, кодирующая одиночный мутантный пептидный 25-мерный антиген KRAS, содержащий мутацию G12D, G12V, G13D или G12C («мономер»); (ii) мРНК, кодирующая конкатемер из трех 25-мерных пептидных антигенов (таким образом, образующих 75-мерный), каждый из которых содержит мутации G12D, G12V и G13D («конкатемер KRAS-3MUT»); (iii) мРНК, кодирующая конкатемер из четырех 25-мерных пептидных антигенов (таким образом, получается 100-мерный), каждый из которых содержит мутации G12D, G12V, G13D и G12C («конкатемер KRAS-4MUT»); или (iv) четыре отдельные мРНК, вводимые вместе, каждая из которых кодирует один мутантный пептидный 25-мерный антиген KRAS, содержащий мутацию G12D, G12V, G13D или G12C («объединенные мономеры»). Аминокислотные и нуклеотидные последовательности конструктов представляют собой такие, как описано в Примере 7. Конкатемерный антиген вирусного эпитопа A11 также тестировали в комбинации со STING или контрольной мРНК (NTFIX) («подтвержденный Аг A11»).

Тестируемые группы показаны в Таблице 16 следующим образом:

**Таблица 16**

| **Исследуемая группа** | **Группа** | **Тестовый/контрольный материал** | **Иммуно-стимулятор** | **Носитель** | **Способ введения** | **Схема применения** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| KRAS-MUT Мономер | 1 | KRAS G12D | STING (V155M) | Соединение 25 | ВМ | 1-е, 14-е сутки |
| | 2 | KRAS G12V | STING (V155M) | Соединение 25 | ВМ | 1-е, 14-е сутки |
| | 3 | KRAS G13D | STING (V155M) | Соединение 25 | ВМ | 1-е, 14-е сутки |
| | 4 | KRAS G12C | STING (V155M) | Соединение 25 | ВМ | 1-е, 14-е сутки |
| KRAS-MUT Конкатемер | 5 | KRAS-3MUT | STING (V155M) | Соединение 25 | ВМ | 1-е, 14-е сутки |
| | 6 | KRAS-4MUT | STING | Соединен | ВМ | 1-е, 14- |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | (V155M) | ие 25 | | е сутки |
| | 7 | KRAS-4MUT.var1 | STING (V155M) | Соединение 25 | ВМ | 1-е, 14-е сутки |
| Объединенные мономеры | 8 | G12D+G12V+G12C+G13D | STING (V155M) | Соединение 25 | ВМ | 1-е, 14-е сутки |
| Подтвержденные Аг А11 | 9 | Конкатемер вирусного эпитопа А11 | STING (V155M) | Соединение 25 | ВМ | 1-е, 14-е сутки |
| | 10 | Конкатемер вирусного эпитопа А11 | NTFIX | Соединение 25 | ВМ | 1-е, 14-е сутки |

В первой серии экспериментов по оценке антигенспецифических ответов CD8+ Т-клеток на антигены KRAS, клетки селезенки на 21-е сутки от мышей повторно стимулировали ex vivo пептидами мономера KRAS (2 мкг/мл на пептид) в течение 5 часов при 37 градусах Цельсия в присутствии GolgiPlug (брефельдина А). Внутриклеточное окрашивание цитокинов (ICS) (ИФН-γ) проводили в отношении KRAS G12D (aa*7/8-16), KRAS G12V (aa*7/8-16), KRAS G13D (aa*7/8-16)), G12C (aa*7/8-16), KRAS ДТ (aa*7/8-16) и без пептида.

Результаты ICS для KRAS-G12V-специфических ответов приведены на **Фиг. 30.** Результаты ICS для KRAS-G12D-специфических ответов приведены на **Фиг. 31.** Эти результаты демонстрируют, что анти-KRAS-G12V и анти-KRAS-G12D-специфические CD8+ Т-клетки были обнаружены у мышей, иммунизированных соответствующей вакциной KRAS-STING (мономер или конкатемер), и повторно стимулированных родственным пептидом. Сравнимый % ИФН-гамма-положительных CD8+ Т-клеток наблюдали, когда мутантные KRAS вводили мышам в качестве мономера или конкатемеров. Ответы, наблюдаемые с G12V, были сильнее, чем ответы, наблюдаемые с G12D. В данном эксперименте ответы анти-KRAS G12C и анти-KRAS G13D не наблюдались (данные не приведены).

Во второй серии экспериментов по оценке антиген-специфических ответов CD8+ Т-клеток на антигены KRAS, клетки селезенки от мышей на 21-е сутки совместно культивировали с HLA*A11-экспрессирующими клетками-мишенями (клетками Cos7-A11), которые активировали с помощью соответствующих пептидов KRAS (контроль G12V, G12D или ДТ), с последующим ICS (ИФН-γ).

Результаты совместного культивирования Cos7-A11 для KRAS-G12V-специфических ответов приведены на **Фиг. 32.** Результаты совместного культивирования Cos7-A11 для KRAS-G12D-специфических ответов приведены на **Фиг. 33.** Эти результаты демонстрируют, что анти-KRAS-G12V и анти-KRAS-G12D-специфические CD8+ Т-клеточные ответы были обнаружены у мышей, иммунизированных соответствующей вакциной KRAS-STING (мономер или конкатемер), и повторно стимулированы клеточной линией, экспрессирующей A11+, активированной с помощью G12V или G12D. Таким образом, результаты этого второго набора экспериментов в отношении выявления антигенспецифических ответов CD8+ Т-клеток в отношении антигенов KRAS были очень похожи на результаты первого набора экспериментов с использованием повторной стимуляции родственными пептидами.

В итоге, способность STING потенцировать антигенспецифический ответ на известные A*11-рестриктированные вирусные эпитопы оценивали с использованием клеток селезенки мышей на 21-е сутки, иммунизированных конкатемером вирусного эпитопа A11. Восемь вирусных эпитопов (EBV BRLF1, FLU, HIV NEF, EBV, коровый антиген HBV, HCV, CMV и BCL-2L1) (по 25 аминокислот каждая) конкатемеризованы и кодировались мРНК для использования в качестве антигена в комбинации со STING в трансгенных мышах A11 (группа лечения 9 в Таблице 16). Конкатемер вирусного эпитопа A11 также вводили вместе с контрольной мРНК NTFIX (группа лечения 10 в Таблице 16). Пять из восьми эпитопов (EBV BRLF1, FLU, HIV NEF, EBV, коровый антиген HBV) подтверждены связывающими веществами A11 с относительно низкими прогнозированными ИК50; другие три эпитопа (HCV, CMV и BCL-2L1) имели более умеренные спрогнозированные аффинности к A11, но не были подтверждены экспериментально. Аминокислотные последовательности для вирусных эпитопов, а также их ИК50 приведены ниже в Таблице 17:

**Таблица 17**

| **Ген** | **Пептид** | **ann_IC50** | **% ранга** | **Подтверждение в литературе** |
|---|---|---|---|---|
| EBV BRLF1 | ATIGTAMYK (SEQ ID NO: 226) | 6,03 | 0,2 | Y |
| FLU | SIIPSGPLK (SEQ ID NO: 227) | 5 | 0,25 | Y |
| HIV NEF | AVDLSHFLK (SEQ ID NO: 228) | 20,31 | 0,25 | Y |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| EBV | AVFDRKSDAK (SEQ ID NO:229) | 55,63 | 0,5 | Y |
| Коровый антиген HBV | YVNVNMGLK (SEQ ID NO: 230) | 69,82 | 0,5 | Y |
| HCV | RVCEKMALY (SEQ ID NO: 231) | 304,91 | 1,3 | |
| CMV | KLGGALQAK (SEQ ID NO: 232) | 736,59 | 1,6 | |

Клетки селезенки на 21-е сутки повторно стимулировали ex vivo отдельными вирусными эпитопами A*11, с последующим ICS (ИФН-γ и ФНО-α) для выявления антигенспецифических CD8+ Т-клеточных ответов. Антигенспецифические CD8+ Т-клеточные ответы наблюдали для четырех из восьми вирусных эпитопов (EBV, EBV BRLF1, FLU и HIV NEF) и, как показано на **Фиг. 34**, STING стимулировали ответы Т-клеток для этих четырех вирусных эпитопов.

Повторное исследование проводили на трансгенных мышах HLA*A11 с использованием конкатемера KRAS-4MUT, или в низкой дозе (10 мкг), или в высокой дозе (30 мкг), в комбинации с иммуностимуляторной мРНК STING в соотношении Аг: STING. 5: 1. Повторно наблюдали значительное усиление G12V-специфических ответов CD8 Т-клеток с помощью конструкта иммуностимулятора STING, причем наибольшее усиление наблюдали при более высокой дозе тестируемого антигена (30 мкг).

Соответственно, результаты, описанные в данном документе, для трансгенных мышей HLA*A11, демонстрируют, что STING иммуностимулирует антигенспецифические Т-клеточные анти-KRAS ответы, а также антивирусные ответы на другие A11-рестриктированные вирусные антигены и способен иммуностимулировать ответы на антигены вакцины в различных формах (мономерных и конкатемерных).

**Другие варианты осуществления изобретения**

Необходимо понимать, что хотя данное раскрытие было изложено в сочетании с его подробным описанием, вышеприведенное описание предназначено для иллюстрации, но не для ограничения объема данного раскрытия, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и изменения находятся в рамках следующих пунктов формулы изобретения.

Все ссылки, описанные в данном документе, включены посредством ссылки во всей их полноте.

**КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

| SEQ ID NO: | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ |
|---|---|
| 1 | MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLG<br>LLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVG<br>PPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNMAHGLAWSYYIGYLRLI<br>LPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQ<br>TGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRL<br>EQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVT<br>VGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS<br>(huSTING(V155M); без эпитопной метки) |
| 2 | MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLG<br>LLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVG<br>PPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNVAHGLAWSYYIGYLRLI<br>LPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQ<br>TGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDtL<br>EQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVT<br>VGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS<br>(Hu STING(R284T); без эпитопной метки) |
| 3 | MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLG<br>LLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVG<br>PPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNVAHGLAWSYYIGYLRLI<br>LPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQ<br>TGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDmL<br>EQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVT<br>VGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS<br>(hu STING(R284M); без эпитопной метки) |
| 4 | MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLG<br>LLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVG<br>PPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNVAHGLAWSYYIGYLRLI<br>LPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQ<br>TGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDkL |

| | |
|---|---|
| | EQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVT<br>VGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS<br>(hu STING(R284K); без эпитопной метки) |
| 5 | MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLG<br>LLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVG<br>PPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFsVAHGLAWSYYIGYLRLI<br>LPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQ<br>TGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRL<br>EQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVT<br>VGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS<br>(Hu STING(N154S); без эпитопной метки) |
| 6 | MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLG<br>LLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVG<br>PPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAlCEKGNFNVAHGLAWSYYIGYLRLI<br>LPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQ<br>TGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRL<br>EQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVT<br>VGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS<br>(Hu STING(V147L); без эпитопной метки) |
| 7 | MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLG<br>LLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVG<br>PPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNVAHGLAWSYYIGYLRLI<br>LPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQ<br>TGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRL<br>EQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQqPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVT<br>VGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS<br>(hu STING(E315Q); без эпитопной метки) |
| 8 | MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLG<br>LLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVG<br>PPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNVAHGLAWSYYIGYLRLI<br>LPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQ<br>TGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRL<br>EQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVT<br>VGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLaTDFS<br>(hu STING(R375A); без эпитопной метки) |

| | |
|---|---|
| 9 | MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLG<br>LLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVG<br>PPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISA**L**CEKGNF**SM**AHGLAWSYYIGYLRLI<br>LPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQ<br>TGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRL<br>EQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVT<br>VGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS<br>(Hu STING(V147L/N154S/V155M); без эпитопной метки) |
| 10 | MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLG<br>LLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVG<br>PPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISA**L**CEKGNF**SM**AHGLAWSYYIGYLRLI<br>LPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQ<br>TGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSRED**M**L<br>EQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVT<br>VGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS<br>(Hu STING(R284M/V147L/N154S/V155M); без эпитопной метки) |
| 11 | METPKPRILPWLVSQLDLGQLEGVAWLDESRTRFRIPWKHGLRQDAQMADFGIFQAW<br>AEASGAYTPGKDKPDVSTWKRNFRSALNRKEVLRLAADNSKDPYDPHKVYEFVTPGA<br>RDFVHLGASPDTNGKSSLPHSQENLPKLFDGLILGPLKDEGSSDLAIVSDPSQQLPS<br>PNVNNFLNPAPQENPLKQLLAEEQWEFEVTAFYRGRQVFQQTLFCPGGLRLVGSTAD<br>MTLPWQPVTLPDPEGFLTDKLVKEYVGQVLKGLGNGLALWQAGQCLWAQRLGHSHAF<br>WALGEELLPDSGRGPDGEVHKDKDGAVFDLRPFVADLIAFMEGSGHSPRYTLWFCMG<br>EMWPQDQPWVKRLVMVKVVPTCLKELLEMAREGGASSLKTVDLHIDNSQPISLTSDQ<br>YKAYLQDLVEDMDFQATGNI<br>(Супермышиный IRF3 S396D; без эпитопной метки) |
| 12 | MGTPKPRILPWLVSQLDLGQLEGVAWVNKSRTRFRIPWKHGLRQDAQQEDFGIFQAW<br>AEATGAYVPGRDKPDLPTWKRNFRSALNRKEGLRLAEDRSKDPHDPHKIYEFVNSGV<br>GDFSQPDTSPDTNGGGSTSDTQEDILDELLGNMVLAPLPDPGPPSLAVAPEPCPQPL<br>RSPSLDNPTPFPNLGPSENPLKRLLVPGEEWEFEVTAFYRGRQVFQQTISCPEGLRL<br>VGSEVGDRTLPGWPVTLPDPGMSLTDRGVMSYVRHVLSCLGGGLALWRAGQWLWAQR<br>LGHCHTYWAVSEELLPNSGHGPDGEVPKDKEGGVFDLGPFIVDLITFTEGSGRSPRY<br>ALWFCVGESWPQDQPWTKRLVMVKVVPTCLRALVEMARVGGASSLENTVDLHIDNSH<br>PLSLTSDQYKAYLQDLVEGMDFQGPGET<br>(Суперчеловеческий IRF3 S396D; без эпитопной метки) |
| 13 | MALAPERAAPRVLFGEWLLGEISSGCYEGLQWLDEARTCFRVPWKHFARKDLSEADA |

| | |
|---|---|
| | RIFKAWAVARGRWPPSSRGGGPPPEAETAERAGWKTNFRCALRSTRRFVMLRDNSGD PADPHKVYALSRELCWREGPGTDQTEAEAPAAVPPPQGGPPGPFLAHTHAGLQAPGP LPAPAGDKGDLLLQAVQQSCLADHLLTASWGADPVPTKAPGEGQEGLPLTGACAGGP GLPAGELYGWAVETTPSPgpqpaalttgeaaapesphqaepylspspsactavqeps pgaldvtimykgrtvlqkvvghpsctflygppdpavratdpqqvafpspaelpdqkq lryteellrhvapglhlelrgpqlwarrmgkckvywevggppgsaspstpacllprn cdtpifdfrvffqelvefrarqrrgsprytiylgfgqdlsagrpkekslvlvklepw lcrvhlegtqrEGVSSLDSSSLSLCLSSANSLYDDIECFLMELEQPA (Изоформа A Hu IRF7 дикого типа; P037 без эпитопной метки) |
| 14 | MALAPERAAPRVLFGEWLLGEISSGCYEGLQWLDEARTCFRVPWKHFARKDLSEADA RIFKAWAVARGRWPPSSRGGGPPPEAETAERAGWKTNFRCALRSTRRFVMLRDNSGD PADPHKVYALSRELCWREGPGTDQTEAEAPAAVPPPQGGPPGPFLAHTHAGLQAPGP LPAPAGDKGDLLLQAVQQSCLADHLLTASWGADPVPTKAPGEGQEGLPLTGACAGGP GLPAGELYGWAVETTPSPgpqpaalttgeaaapesphqaepylspspsactavqeps pgaldvtimykgrtvlqkvvghpsctflygppdpavratdpqqvafpspaelpdqkq lryteellrhvapglhlelrgpqlwarrmgkckvywevggppgsaspstpacllprn cdtpifdfrvffqelvefrarqrrgsprytiylgfgqdlsagrpkekslvlvklepw lcrvhlegtqrEGVSSLDSSdLdLCLSSANSLYDDIECFLMELEQPA (конститутивно активный Hu IRF7 S477D/S479D; P033 без эпитопной метки) |
| 15 | MALAPERAAPRVLFGEWLLGEISSGCYEGLQWLDEARTCFRVPWKHFARKDLSEADA RIFKAWAVARGRWPPSSRGGGPPPEAETAERAGWKTNFRCALRSTRRFVMLRDNSGD PADPHKVYALSRELCWREGPGTDQTEAEAPAAVPPPQGGPPGPFLAHTHAGLQAPGP LPAPAGDKGDLLLQAVQQSCLADHLLTASWGADPVPTKAPGEGQEGLPLTGACAGGP GLPAGELYGWAVETTPSPgpqpaalttgeaaapesphqaepylspspsactavqeps pgaldvtimykgrtvlqkvvghpsctflygppdpavratdpqqvafpspaelpdqkq lryteellrhvapglhlelrgpqlwarrmgkckvywevggppgsaspstpacllprn cdtpifdfrvffqelvefrarqrrgsprytiylgfgqdlsagrpkekslvlvklepw lcrvhlegtqrEGVSSLDdSdLSdCLSSANSLYDDIECFLMELEQPA (конститутивно активный Hu IRF7 S475D/S477D/L480D; P034 без эпитопной метки) |
| 16 | MALAPERAAPRVLFGEWLLGEISSGCYEGLQWLDEARTCFRVPWKHFARKDLSEADA RIFKAWAVARGRWPPSSRGGGPPPEAETAERAGWKTNFRCALRSTRRFVMLRDNSGD PADPHKVYALSRELCWREGPGTDQTEAEAPAAVPPPQGGPPGPFLAHTHAGLQAPGP |

| | |
|---|---|
| | LPAPAGDKGDLLLQAVQQSCLADHLLTASWGADPVPTKAPGEGQEGLPLTGACAGGP GLPAGELYGWAVETTPSPgpqpaalttgeaaapesphqaepylspspsactavqeps pgaldvtimykgrtvlqkvvghpsctflygppdpavratdpqqvafpspaelpdqkq lryteellrhvapglhlelrgpqlwarrmgkckvywevggppgsaspstpacllprn cdtpifdfrvffqelvefrarqrrgsprytiylgfgqdlsagrpkekslvlvklepw lcrvhlegtqrEGVSSLDdddLdLCLdSANdLYDDIECFLMELEQPA (конститутивно активный Hu IRF7 S475D/S476D/S477D/S479D/S483D/S487D; P035 без эпитопной метки) |
| 17 | MALAPERAAPRVLFGEWLLGEISSGCYEGLQWLDEARTCFRVPWKHFARKDLSEADA RIFKAWAVARGRWPPSSRGGGPPPEAETAERAGWKTNFRCALRSTRRFVMLRDNSGD PADPHKVYALSRELCWREGPGTDQTEAEAPAAVPPPQGGPPGPFLAHTHAGLQAPGP LPAPAGDKGDLLLQAVQQSCLADHLLTASWGADPVPTKAPGEGQEGLPLTGACAGGP GLPAGELYGWAVETTPSPEGVSSLDSSSLSLCLSSANSLYDDIECFLMELEQPA (конститутивно активный усеченный Hu IRF7 1-246+468-503; P032 без эпитопной метки) |
| 18 | MALAPERAAPRVLFGEWLLGEISSGCYEGLQWLDEARTCFRVPWKHFARKDLSEADA RIFKAWAVARGRWPPSSRGGGPPPEAETAERAGWKTNFRCALRSTRRFVMLRDNSGD PADPHKVYALSRELCWREGPGTDQTEAEAPAAVPPPQGGPPGPFLAHTHAGLQAPGP LPAPAGDKGDLLLQAVQQSCLADHLLTASWGADPVPTKAPGEGQEGLPLTGACAGGP GLPAGELYGWAVETTPSPEGVSSLDdddLdLCLdSANdLYDDIECFLMELEQPA (конститутивно активный усеченный Hu IRF7 1-246+468-503 плюс S475D/S476D/S477D/S479D/S483D/S487D; P036 без эпитопной метки) |
| 19 | MALAPERAAPRVLFGEWLLGEISSGCYEGLQWLDEARTCFRVPWKHFARKDLSEADA RIFKAWAVARGRWPPSSRGGGPPPEAETAERAGWKTNFRCALRSTRRFVMLRDNSGD PADPHKVYALSRELCWREGPGTDQTEAEAPAAVPPPQgpqpaalttgeaaapesphq aepylspspsactavqepspgaldvtimykgrtvlqkvvghpsctflygppdpavra tdpqqvafpspaelpdqkqlryteellrhvapglhlelrgpqlwarrmgkckvywev ggppgsaspstpacllprncdtpifdfrvffqelvefrarqrrgsprytiylgfgqd lsagrpkekslvlvklepwlcrvhlegtqrEGVSSLDSSSLSLCLSSANSLYDDIEC FLMELEQPA (усеченный Hu IRF7 1-151+247-503; P038 без эпитопной метки; нулевая мутация) |
| 20 | MGGPPGPFLAHTHAGLQAPGPLPAPAGDKGDLLLQAVQQSCLADHLLTASWGADPVP |

| | |
|---|---|
| | TKAPGEGQEGLPLTGACAGGPGLPAGELYGWAVETTPSPgpqpaalttgeaaapesp hqaepylspspsactavqepspgaldvtimykgrtvlqkvvghpsctflygppdpav ratdpqqvafpspaelpdqkqlryteellrhvapglhlelrgpqlwarrmgkckvyw evggppgsaspstpacllprncdtpifdfrvffqelvefrarqrrgsprytiylgfg qdlsagrpkekslvlvklepwlcrvhlegtqrEGVSSLDSSSLSLCLSSANSLYDDI ECFLMELEQPA (усеченный Hu IRF7 152-503; P039 без эпитопной метки; нулевая мутация) |
| 21 | TCAAGCTTTTGGACCCTCGTACAGAAGCTAATACGACTCACTATAGGGAAATAAGAG AGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACC (5'-HTO) |
| 22 | TGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCTTGGGCCTCCCCCCAG CCCCTCCTCCCCTTCCTGCACCCGTACCCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGG GCGGC (3'-HTO) |
| 23 | TGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCTTGGGCCCAAACACCA TTGTCACACTCCATCCCCCCAGCCCCTCCTCCCCTTCCTCCATAAAGTAGGAAACAC TACATGCACCCGTACCCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC (3'-HTO с сайтами mi-122 и mi-142.3p) |
| 24 | GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (аминокислотная последовательность пептида 2A) |
| 25 | GGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAAC CCTGGACCT (Нуклеотидная последовательность, кодирующая пептид 2A) |
| 26 | TCCGGACTCAGATCCGGGGATCTCAAAATTGTCGCTCCTGTCAAACAAACTCTTAAC TTTGATTTACTCAAACTGGCTGGGGATGTAGAAAGCAATCCAGGTCCACTC (Нуклеотидная последовательность, кодирующая пептид 2A) |
| 27 | GACAGUGCAGUCACCCAUAAAGUAGAAAGCACUACUAACAGCACUGGAGGGUGUAGU GUUUCCUACUUUAUGGAUGAGUGUACUGUG (miR-142) |
| 28 | UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA (miR-142-3p) |
| 29 | UCCAUAAAGUAGGAAACACUACA (сайт связывания miR-142-3p) |
| 30 | CAUAAAGUAGAAAGCACUACU |

| | |
|---|---|
| | (miR-142-5p) |
| 31 | AGUAGUGCUUUCUACUUUAUG<br>(сайт связывания miR-142-5p) |
| 32 | AACGCCAUUAUCACACUAAAUA<br>(miR-122-3p) |
| 33 | UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG<br>(miR-122-5p) |
| 34 | UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA<br>(miR-21-5p) |
| 35 | CAACACCAGUCGAUGGGCUGU<br>(miR-21-3p) |
| 36 | MKLVVVGADGVGKSAL<br>(KRAS(G12D)15mer) |
| 37 | MKLVVVGAVGVGKSAL<br>(KRAS(G12V)15mer) |
| 38 | MLVVVGAGDVGKSALT<br>(KRAS(G13D)15mer) |
| 39 | MTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQ<br>(KRAS(G12D)25mer) |
| 40 | MTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQ<br>(KRAS(G12V)25mer) |
| 41 | MTEYKLVVVGAGDVGKSALTIQLIQ<br>(KRAS(G13D)25mer) |
| 42 | MKLVVVGADGVGKSALKLVVVGADGVGKSALKLVVVGADGVGKSAL<br>(KRAS(G12D)15mer^3) |
| 43 | MKLVVVGAVGVGKSALKLVVVGAVGVGKSALKLVVVGAVGVGKSAL<br>(KRAS(G12V)15mer^3) |
| 44 | MLVVVGAGDVGKSALTLVVVGAGDVGKSALTLVVVGAGDVGKSALT<br>(KRAS(G13D)15mer^3) |
| 45 | MTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQMTEYKLV<br>VVGADGVGKSALTIQLIQ<br>(KRAS(G12D)25mer^3) |
| 46 | MTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQMTEYKLV<br>VVGAVGVGKSALTIQLIQ<br>(KRAS(G12V)25mer^3) |

| | |
|---|---|
| 47 | MTEYKLVVVGAGDVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGAGDVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGAGDVGKSALTIQLIQ<br>(KRAS(G13D)25mer^3) |
| 48 | MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNMAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFSATNFSLLKQAGDVEENPGPMKLVVVGADGVGKSAL<br>(KRAS(G12D)15mer_nt.STING(V155M)) |
| 49 | MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNMAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFSATNFSLLKQAGDVEENPGPMKLVVVGAVGVGKSAL<br>(KRAS(G12V)15mer_nt.STING(V155M) |
| 50 | MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNMAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFSATNFSLLKQAGDVEENPGPMLVVVGAGDVGKSALT<br>(KRAS(G13D)15mer_nt.STING(V155M) |
| 51 | MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNMAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFSATNFSLLKQAGDVEENPGPMTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQ<br>(KRAS(G12D)25mer_nt.STING(V155M)) |

| | |
|---|---|
| 52 | MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLGLLLN<br>GVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVGPPFTWMLA<br>LLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNMAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYN<br>QHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSI<br>YELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPES<br>QNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLIS<br>GMEKPLPLRTDFSATNFSLLKQAGDVEENPGPMTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQ<br>(KRAS(G12V)25mer_nt.STING(V155M) |
| 53 | MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLGLLLN<br>GVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVGPPFTWMLA<br>LLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNMAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYN<br>QHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSI<br>YELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPES<br>QNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLIS<br>GMEKPLPLRTDFSATNFSLLKQAGDVEENPGPMTEYKLVVVGAGDVGKSALTIQLIQ<br>(KRAS(G13D)25mer_nt.STING(V155M) |
| 54 | MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLG<br>LLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVG<br>PPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNMAHGLAWSYYIGYLRLI<br>LPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQ<br>TGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRL<br>EQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVT<br>VGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFSATNFSLLKQAGDVEENPGPM<br>KLVVVGADGVGKSALKLVVVGADGVGKSALKLVVVGADGVGKSAL<br>(KRAS(G12D)15mer^3_nt.STING(V155M)) |
| 55 | MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLG<br>LLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVG<br>PPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNMAHGLAWSYYIGYLRLI<br>LPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQ<br>TGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRL<br>EQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVT<br>VGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFSATNFSLLKQAGDVEENPGPM<br>KLVVVGAVGVGKSALKLVVVGAVGVGKSALKLVVVGAVGVGKSAL<br>(KRAS(G12V)15mer^3_nt.STING(V155M) |
| 56 | MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLG |

| | |
|---|---|
| | LLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVG<br>PPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNMAHGLAWSYYIGYLRLI<br>LPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQ<br>TGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRL<br>EQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVT<br>VGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFSATNFSLLKQAGDVEENPGPM<br>LVVVGAGDVGKSALTLVVVGAGDVGKSALTLVVVGAGDVGKSALT<br>(KRAS(G13D)15mer^3_nt.STING(V155M) |
| 57 | MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLG<br>LLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVG<br>PPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNMAHGLAWSYYIGYLRLI<br>LPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQ<br>TGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRL<br>EQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVT<br>VGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFSATNFSLLKQAGDVEENPGPM<br>TEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQMTEYKLVV<br>VGADGVGKSALTIQLIQ<br>(KRAS(G12D)25mer^3_nt.STING(V155M)) |
| 58 | MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLG<br>LLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVG<br>PPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNMAHGLAWSYYIGYLRLI<br>LPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQ<br>TGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRL<br>EQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVT<br>VGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFSATNFSLLKQAGDVEENPGPM<br>TEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQMTEYKLVV<br>VGAVGVGKSALTIQLIQ<br>(KRAS(G12V)25mer^3_nt.STING(V155M) |
| 59 | MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLG<br>LLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVG<br>PPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNMAHGLAWSYYIGYLRLI<br>LPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQ<br>TGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRL<br>EQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVT<br>VGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFSATNFSLLKQAGDVEENPGPM |

| | |
|---|---|
| | TEYKLVVVGAGDVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGAGDVGKSALTIQLIQMTEYKLVV<br>VGAGDVGKSALTIQLIQ<br>(KRAS(G13D)25mer^3_nt.STING(V155M) |
| 60 | MKLVVVGADGVGKSALATNFSLLKQAGDVEENPGPMPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLL<br>SACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRA<br>CLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVC<br>EKGNFNMAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVP<br>DNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFA<br>MSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLR<br>HLRQEEKEEVTVGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS<br>(KRAS(G12D)15mer_ct.STING(V155M)) |
| 61 | MKLVVVGAVGVGKSALATNFSLLKQAGDVEENPGPMPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLL<br>SACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRA<br>CLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVC<br>EKGNFNMAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVP<br>DNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFA<br>MSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLR<br>HLRQEEKEEVTVGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS<br>(KRAS(G12V)15mer_ct.STING(V155M) |
| 62 | MLVVVGAGDVGKSALTATNFSLLKQAGDVEENPGPMPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLL<br>SACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRA<br>CLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVC<br>EKGNFNMAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVP<br>DNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFA<br>MSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLR<br>HLRQEEKEEVTVGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS<br>(KRAS(G13D)15mer_ct.STING(V155M) |
| 63 | MTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQATNFSLLKQAGDVEENPGPMPHSSLHPSIPCPRGHG<br>AQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYR<br>GSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGL<br>APAEISAVCEKGNFNMAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYI<br>LLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEY<br>ATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSS<br>FSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS<br>(KRAS(G12D)25mer_ct.STING(V155M)) |

| | |
|---|---|
| 64 | MTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQATNFSLLKQAGDVEENPGPMPHSSLHPSIPCPRGHG<br>AQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYR<br>GSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGL<br>APAEISAVCEKGNFNMAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYI<br>LLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEY<br>ATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSS<br>FSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS<br>(KRAS(G12V)25mer_ct.STING(V155M) |
| 65 | MTEYKLVVVGAGDVGKSALTIQLIQATNFSLLKQAGDVEENPGPMPHSSLHPSIPCPRGHG<br>AQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYR<br>GSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGL<br>APAEISAVCEKGNFNMAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYI<br>LLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEY<br>ATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSS<br>FSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS<br>(KRAS(G13D)25mer_ct.STING(V155M) |
| 66 | MKLVVVGADGVGKSALKLVVVGADGVGKSALKLVVVGADGVGKSALATNFSLLKQAG<br>DVEENPGPMPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVL<br>HLASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFY<br>YSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNMAHGLAWSY<br>YIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIR<br>FLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQA<br>GFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLR<br>QEEKEEVTVGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS<br>(KRAS(G12D)15mer^3_ct.STING(V155M)) |
| 67 | MKLVVVGAVGVGKSALKLVVVGAVGVGKSALKLVVVGAVGVGKSALATNFSLLKQAG<br>DVEENPGPMPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVL<br>HLASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFY<br>YSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNMAHGLAWSY<br>YIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIR<br>FLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQA<br>GFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLR<br>QEEKEEVTVGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS<br>(KRAS(G12V)15mer^3_ct.STING(V155M) |
| 68 | MLVVVGAGDVGKSALTLVVVGAGDVGKSALTLVVVGAGDVGKSALTATNFSLLKQAG |

| | |
|---|---|
| | DVEENPGPMPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVL<br>HLASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFY<br>YSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNMAHGLAWSY<br>YIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIR<br>FLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQA<br>GFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLR<br>QEEKEEVTVGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS<br>(KRAS(G13D)15mer^3_ct.STING(V155M) |
| 69 | MTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQMTEYKLV<br>VVGADGVGKSALTIQLIQATNFSLLKQAGDVEENPGPMPHSSLHPSIPCPRGHGAQK<br>AALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRY<br>RGSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALNILL<br>GLKGLAPAEISAVCEKGNFNMAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLR<br>GAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELL<br>ENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPES<br>QNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSLKTSAVPSTSTMSQEPE<br>LLISGMEKPLPLRTDFS<br>(KRAS(G12D)25mer^3_ct.STING(V155M)) |
| 70 | MTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQMTEYKLV<br>VVGAVGVGKSALTIQLIQATNFSLLKQAGDVEENPGPMPHSSLHPSIPCPRGHGAQK<br>AALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRY<br>RGSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALNILL<br>GLKGLAPAEISAVCEKGNFNMAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLR<br>GAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELL<br>ENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPES<br>QNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSLKTSAVPSTSTMSQEPE<br>LLISGMEKPLPLRTDFS<br>(KRAS(G12V)25mer^3_ct.STING(V155M) |
| 71 | MTEYKLVVVGAGDVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGAGDVGKSALTIQLIQMTEYKLV<br>VVGAGDVGKSALTIQLIQATNFSLLKQAGDVEENPGPMPHSSLHPSIPCPRGHGAQK<br>AALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRY<br>RGSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALNILL<br>GLKGLAPAEISAVCEKGNFNMAHGLAWSYYIGYLRLILPELQARIRTYNQHYNNLLR<br>GAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELL<br>ENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPES |

| | |
|---|---|
| | QNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVTVGSLKTSAVPSTSTMSQEPE<br>LLISGMEKPLPLRTDFS<br>(KRAS(G13D)25mer^3_ct.STING(V155M) |
| 72 | MTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQ<br>(KRAS(G12C)25mer) |
| 73 | MTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQMTEYKLV<br>VVGACGVGKSALTIQLIQ<br>(KRAS(G12C)25mer^3) |
| 74 | MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQ<br>(KRAS(WT)25mer) |
| 75 | MSAGDPRVGSGSLDSFMFSIPLVALNVGVRRRLSLFLNPRTPVAADWTLLAEEMGFE<br>YLEIRELETRPDPTRSLLDAWQGRSGASVGRLLELLALLDREDILKELKSRIEEDCQ<br>KYLGKQQNQESEKPLQVARVESSVPQTKELGGITTLDDPLGQTPELFDAFICYCPND<br>IEFVQEMIRQLEQTDYRLKLCVSDRDVLPGTCVWSIASELIEKRCRRMVVVVSDDYL<br>QSKECDFQTKFALSLSPGVQQKRPIPIKYKAMKKDFPSILRFITICDYTNPCTKSWF<br>WTRLAKALSLP<br>(человеческий myd88(L265P); P4027 без эпитопной метки) |
| 76 | MAAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLAALNMRVRRRLSLFLNVRTQVAADWTALAEEMDFE<br>YLEIRQLETQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRLLELLTKLGRDDVLLELGPSIEEDCQ<br>KYILKQQQEEAEKPLQVAAVDSSVPRTAELAGITTLDDPLGHMPERFDAFICYCPSD<br>IQFVQEMIRQLEQTNYRLKLCVSDRDVLPGTCVWSIASELIEKRCRRMVVVVSDDYL<br>QSKECDFQTKFALSLSPGAHQKRPIPIKYKAMKKEFPSILRFITVCDYTNPCTKSWF<br>WTRLAKALSLP<br>(мышиный myd88(L265P); P4028 без эпитопной метки) |
| 77 | MGVGKSKLDKCPLSWHKKDSVDADQDGHESDSKNSEEACLRGFVEQSSGSEPPTGEQ<br>DQPEAKGAGPEEQDEEEFLKFVILHAEDDTDEALRVQDLLQNDFGIRPGIVFAEMPC<br>GRLHLQNLDDAVNGSAWTILLLTENFLRDTWCNFQFYTSLMNSVSRQHKYNSVIPMR<br>PLNSPLPRERTPLALQTINALEEESQGFSTQVERIFRESVFERQQSIWKETRSVSQK<br>QFIA<br>(мышиный TRAM (TICAM2); P4033 без эпитопной метки) |
| 78 | MSLWGLVSKMPPEKVQRLYVDFPQHLRHLLGDWLESQPWEFLVGSDAFCCNLASALL<br>SDTVQHLQASVGEQGEGSTILQHISTLESIYQRDPLKLVATFRQILQGEKKAVMEQF<br>RHLPMPFHWKQEELKFKTGLRRLQHRVGEIHLLREALQKGAEAGQVSLHSLIETPAN<br>GTGPSEALAMLLQETTGELEAAKALVLKRIQIWKRQQQLAGNGAPFEESLAPLQERC<br>ESLVDIYSQLQQEVGAAGGELEPKTRASLTGRLDEVLRTLVTSCFLVEKQPPQVLKT |

| | |
|---|---|
| | QTKFQAGVRFLLGLRFLGAPAKPPLVRADMVTEKQARELSVPQGPGAGAESTGEIIN<br>NTVPLENSIPGNCCSALFKNLLLKKIKRCERKGTESVTEEKCAVLFSASFTLGPGKL<br>PIQLQALSLPLVVIVHGNQDNNAKATILWDNAFSEMDRVPFVVAERVPWEKMCETLN<br>LKFMAEVGTNRGLLPEHFLFLAQKIFNDNSLSMEAFQHRSVSWSQFNKEILLGRGFT<br>FWQWFDGVLDLTKRCLRSYWSDRLIIGFISKQYAASLLLNEPDGTFLLRFSDSEIGG<br>ITIAHVIRGQDGSPQIENIQPFSAKDLSIRSLGDRIRDLAQLKNLYPKKPKDEAFRS<br>HYKPEQMGKDGRGYVPATIKMTVERDQPLPTPELQMPTMVPSYDLGMAPDSSMSMQL<br>GPDMVPQVYPPHSHSIPPYQGLSPEESVNVLSAFQEPHLQMPPSLGQMSLPFDQPHP<br>QGLLPCQPQEHAVSSPDPLLCSDVTMVEDSCLSQPVTAFPQGTWIGEDIFPPLLPPT<br>EQDLTKLLLEGQGESGGGSLGAQPLLQPSHYGQSGISMSHMDLRANPSW<br>(STAT6 V547A/T548A); P008 без эпитопной метки) |
| 79 | MSLWGLVSKMPPEKVQRLYVDFPQHLRHLLGDWLESQPWEFLVGSDAFCCNLASALL<br>SDTVQHLQASVGEQGEGSTILQHISTLESIYQRDPLKLVATFRQILQGEKKAVMEQF<br>RHLPMPFHWKQEELKFKTGLRRLQHRVGEIHLLREALQKGAEAGQVSLHSLIETPAN<br>GTGPSEALAMLLQETTGELEAAKALVLKRIQIWKRQQQLAGNGAPFEESLAPLQERC<br>ESLVDIYSQLQQEVGAAGGELEPKTRASLTGRLDEVLRTLVTSCFLVEKQPPQVLKT<br>QTKFQAGVRFLLGLRFLGAPAKPPLVRADMVTEKQARELSVPQGPGAGAESTGEIIN<br>NTVPLENSIPGNCCSALFKNLLLKKIKRCERKGTESVTEEKCAVLFSASFTLGPGKL<br>PIQLQALDLPLVVIVHGNQDNNAKATILWDNAFSEMDRVPFVVAERVPWEKMCETLN<br>LKFMAEVGTNRGLLPEHFLFLAQKIFNDNSLSMEAFQHRSVSWSQFNKEILLGRGFT<br>FWQWFDGVLDLTKRCLRSYWSDRLIIGFISKQYVTSLLLNEPDGTFLLRFSDSEIGG<br>ITIAHVIRGQDGSPQIENIQPFSAKDLSIRSLGDRIRDLAQLKNLYPKKPKDEAFRS<br>HYKPEQMGKDGRGYVPATIKMTVERDQPLPTPELQMPTMVPSYDLGMAPDSSMSMQL<br>GPDMVPQVYPPHSHSIPPYQGLSPEESVNVLSAFQEPHLQMPPSLGQMSLPFDQPHP<br>QGLLPCQPQEHAVSSPDPLLCSDVTMVEDSCLSQPVTAFPQGTWIGEDIFPPLLPPT<br>EQDLTKLLLEGQGESGGGSLGAQPLLQPSHYGQSGISMSHMDLRANPSW<br>(STAT6 (S407D); P009 без эпитопной метки) |
| 80 | MSLWGLVSKMPPEKVQRLYVDFPQHLRHLLGDWLESQPWEFLVGSDAFCCNLASALL<br>SDTVQHLQASVGEQGEGSTILQHISTLESIYQRDPLKLVATFRQILQGEKKAVMEQF<br>RHLPMPFHWKQEELKFKTGLRRLQHRVGEIHLLREALQKGAEAGQVSLHSLIETPAN<br>GTGPSEALAMLLQETTGELEAAKALVLKRIQIWKRQQQLAGNGAPFEESLAPLQERC<br>ESLVDIYSQLQQEVGAAGGELEPKTRASLTGRLDEVLRTLVTSCFLVEKQPPQVLKT<br>QTKFQAGVRFLLGLRFLGAPAKPPLVRADMVTEKQARELSVPQGPGAGAESTGEIIN<br>NTVPLENSIPGNCCSALFKNLLLKKIKRCERKGTESVTEEKCAVLFSASFTLGPGKL<br>PIQLQALDLPLVVIVHGNQDNNAKATILWDNAFSEMDRVPFVVAERVPWEKMCETLN |

| | |
|---|---|
| | LKFMAEVGTNRGLLPEHFLFLAQKIFNDNSLSMEAFQHRSVSWSQFNKEILLGRGFT<br>FWQWFDGVLDLTKRCLRSYWSDRLIIGFISKQYAASLLLNEPDGTFLLRFSDSEIGG<br>ITIAHVIRGQDGSPQIENIQPFSAKDLSIRSLGDRIRDLAQLKNLYPKKPKDEAFRS<br>HYKPEQMGKDGRGYVPATIKMTVERDQPLPTPELQMPTMVPSYDLGMAPDSSMSMQL<br>GPDMVPQVYPPHSHSIPPYQGLSPEESVNVLSAFQEPHLQMPPSLGQMSLPFDQPHP<br>QGLLPCQPQEHAVSSPDPLLCSDVTMVEDSCLSQPVTAFPQGTWIGEDIFPPLLPPT<br>EQDLTKLLLEGQGESGGGSLGAQPLLQPSHYGQSGISMSHMDLRANPSW<br>(STAT6 (S407D/V547A/T548A); P010 без эпитопной метки) |
| 81 | MSLWGLVSKMPPEKVQRLYVDFPQHLRHLLGDWLESQPWEFLVGSDAFCCNLASALL<br>SDTVQHLQASVGEQGEGSTILQHISTLESIYQRDPLKLVATFRQILQGEKKAVMEQF<br>RHLPMPFHWKQEELKFKTGLRRLQHRVGEIHLLREALQKGAEAGQVSLHSLIETPAN<br>GTGPSEALAMLLQETTGELEAAKALVLKRIQIWKRQQQLAGNGAPFEESLAPLQERC<br>ESLVDIYSQLQQEVGAAGGELEPKTRASLTGRLDEVLRTLVTSCFLVEKQPPQVLKT<br>QTKFQAGVRFLLGLRFLGAPAKPPLVRADMVTEKQARELSVPQGPGAGAESTGEIIN<br>NTVPLENSIPGNCCSALFKNLLLKKIKRCERKGTESVTEEKCAVLFSASFTLGPGKL<br>PIQLQALSLPLVVIVHGNQDNNAKATILWDNAFSEMDRVPFVVAERVPWEKMCETLN<br>LKFMAEVGTNRGLLPEHFLFLAQKIFNDNSLSMEAFQHRSVSWSQFNKEILLGRGFT<br>FWQWFDGVLDLTKRCLRSYWSDRLIIGFISKQYAASLLLNEPDGTFLLRFSDSEIGG<br>ITIAHVIRGQDGSPQIENIQPFSAKDLSIRSLGDRIRDLAQLKNLYPKKPKDEAFRS<br>HYKPEQMGKDGRGFVPATIKMTVERDQPLPTPELQMPTMVPSYDLGMAPDSSMSMQL<br>GPDMVPQVYPPHSHSIPPYQGLSPEESVNVLSAFQEPHLQMPPSLGQMSLPFDQPHP<br>QGLLPCQPQEHAVSSPDPLLCSDVTMVEDSCLSQPVTAFPQGTWIGEDIFPPLLPPT<br>EQDLTKLLLEGQGESGGGSLGAQPLLQPSHYGQSGISMSHMDLRANPSW<br>(STAT6 (V547A/T548A/Y641F); P011 без эпитопной метки) |
| 82 | SAEVIHQVEEALDTDEKEMLLFLCRDVAIDVVPPNVRDLLDILRERGKLSVGDLAEL<br>LYRVRRFDLLKRILKMDRKAVETHLLRNPHLVSDYRVLMAEIGEDLDKSDVSSLIFL<br>MKDYMGRGKISKEKSFLDLVVELEKLNLVAPDQLDLLEKCLKNIHRIDLKTKIQKYK<br>QSVQGAGTSYRNVLQAAIQKSLKDPSNNFRLHNGRSKEQRLKEQLGAQQEPVKKSIQ<br>ESEAFLPQSIPEERYKMKSKPLGICLIIDCIGNETELLRDTFTSLGYEVQKFLHLSM<br>HGISQILGQFACMPEHRDYDSFVCVLVSRGGSQSVYGVDQTHSGLPLHHIRRMFMGD<br>SCPYLAGKPKMFFIQNYVVSEGQLEDSSLLEVDGPAMKNVEFKAQKRGLCTVHREAD<br>FFWSLCTADMSLLEQSHSSPSLYLQCLSQKLRQERKRPLLDLHIELNGYMYDWNSRV<br>SAKEKYYVWLQHTLRKKLILSYT<br>(hu-cFLIP-L; P1006 без эпитопной метки) |
| 83 | SAEVIHQVEEALDTDEKEMLLFLCRDVAIDVVPPNVRDLLDILRERGKLSVGDLAEL |

| | |
|---|---|
| | LYRVRRFDLLKRILKMDRKAVETHLLRNPHLVSDYRVLMAEIGEDLDKSDVSSLIFL<br>MKDYMGRGKISKEKSFLDLVVELEKLNLVAPDQLDLLEKCLKNIHRIDLKTKIQKYK<br>QSVQGAGTSYRNVLQAAIQKSLKDPSNNFRLHNGRSKEQRLKEQLGAQQEPVKKS<br>(hu-cFLIP-S(1-227); P1007 без эпитопной метки) |
| 84 | SAEVIHQVEEALDTDEKEMLLFLCRDVAIDVVPPNVRDLLDILRERGKLSVGDLAEL<br>LYRVRRFDLLKRILKMDRKAVETHLLRNPHLVSDYRVLMAEIGEDLDKSDVSSLIFL<br>MKDYMGRGKISKEKSFLDLVVELEKLNLVAPDQLDLLEKCLKNIHRIDLKTKIQKYK<br>QSVQGAGTSYRNVLQAAIQKSLKD<br>(hu-cFLIP-p22(1-198); P1008 без эпитопной метки) |
| 85 | SAEVIHQVEEALDTDEKEMLLFLCRDVAIDVVPPNVRDLLDILRERGKLSVGDLAEL<br>LYRVRRFDLLKRILKMDRKAVETHLLRNPHLVSDYRVLMAEIGEDLDKSDVSSLIFL<br>MKDYMGRGKISKEKSFLDLVVELEKLNLVAPDQLDLLEKCLKNIHRIDLKTKIQKYK<br>QSVQGAGTSYRNVLQAAIQKSLKDPSNNFRLHNGRSKEQRLKEQLGAQQEPVKKSIQ<br>ESEAFLPQSIPEERYKMKSKPLGICLIIDCIGNETELLRDTFTSLGYEVQKFLHLSM<br>HGISQILGQFACMPEHRDYDSFVCVLVSRGGSQSVYGVDQTHSGLPLHHIRRMFMGD<br>SCPYLAGKPKMFFIQNYVVSEGQLEDSSLLEVD<br>(hu-cFLIP-p43(1-376); P1009 без эпитопной метки) |
| 86 | GPAMKNVEFKAQKRGLCTVHREADFFWSLCTADMSLLEQSHSSPSLYLQCLSQKLRQ<br>ERKRPLLDLHIELNGYMYDWNSRVSAKEKYYVWLQHTLRKKLILSYT<br>(hu-cFLIP-p12(377-480); P1010 без эпитопной метки) |
| 87 | MSWSPSLTTQTCGAWEMKERLGTGGFGNVIRWHNQETGEQIAIKQCRQELSPRNRERWCL<br>EIQIMRRLTH<br>PNVVAARDVPEGMQNLAPNDLPLLAMEYCQGGDLRKYLNQFENCCGLREGAILTLLSDIA<br>SALRYLHEN<br>RIIHRDLKPENIVLQQGEQRLIHKIIDLGYAKELDQGELCTEFVGTLQYLAPELLEQQKY<br>TVTVDYWSFGTLAF<br>ECITGFRPFLPNWQPVQWHSKVRQKSEVDIVVSEDLNGTVKFSSSLPYPNNLNSVLAERL<br>EKWLQLMLM<br>WHPRQRGTDPTYGPNGCFKALDDILNLKLVHILNMVTGTIHTYPVTEDESLQSLKARIQQ<br>DTGIPEEDQELL<br>QEAGLALIPDKPATQCISDGKLNEGHTLDMDLVFLFDNSKITYETQISPRPQPESVSCIL<br>QEPKRNLAFFQLRK<br>VWGQVWHSIQTLKEDCNRLQQGQRAAMMNLLRNNSCLSKMKNSMASMSQQLKAKLDFFKT<br>SIQIDLEK<br>YSEQTEFGITSDKLLLAWREMEQAVELCGRENEVKLLVERMMALQTDIVDLQRSPMGRKQ |

| | |
|---|---|
| | GGTLDDLEEQ<br>ARELYRRLREKPRDQRTEGDSQEMVRLLLQAIQSFEKKVRVIYTQLSKTVVCKQKALELL<br>PKVEEVVSLMN<br>EDEKTVVRLQEKRQKELWNLLKIACSKVRGPVSGSPDSMNASRLSQPGQLMSQPSTASNS<br>LPEPAKKSEEL<br>VAEAHNLCTLLENAIQDTVREQDQSFTALDWSWLQTEEEEHSCLEQAS<br>(huIKK2ca(S177E/S181E); P4005 без эпитопной метки) |
| 88 | MSWSPSLTTQTCGAWEMKERLGTGGFGNVIRWHNQETGEQIAIKQCRQELSPRNRERWCL<br>EIQIMRRLTH<br>PNVVAARDVPEGMQNLAPNDLPLLAMEYCQGGDLRKYLNQFENCCGLREGAILTLLSDIA<br>SALRYLHEN<br>RIIHRDLKPENIVLQQGEQRLIHKIIDLGYAKELDQGALCTAFVGTLQYLAPELLEQQKY<br>TVTVDYWSFGTLAF<br>ECITGFRPFLPNWQPVQWHSKVRQKSEVDIVVSEDLNGTVKFSSSLPYPNNLNSVLAERL<br>EKWLQLMLM<br>WHPRQRGTDPTYGPNGCFKALDDILNLKLVHILNMVTGTIHTYPVTEDESLQSLKARIQQ<br>DTGIPEEDQELL<br>QEAGLALIPDKPATQCISDGKLNEGHTLDMDLVFLFDNSKITYETQISPRPQPESVSCIL<br>QEPKRNLAFFQLRK<br>VWGQVWHSIQTLKEDCNRLQQGQRAAMMNLLRNNSCLSKMKNSMASMSQQLKAKLDFFKT<br>SIQIDLEK<br>YSEQTEFGITSDKLLLAWREMEQAVELCGRENEVKLLVERMMALQTDIVDLQRSPMGRKQ<br>GGTLDDLEEQ<br>ARELYRRLREKPRDQRTEGDSQEMVRLLLQAIQSFEKKVRVIYTQLSKTVVCKQKALELL<br>PKVEEVVSLMN<br>EDEKTVVRLQEKRQKELWNLLKIACSKVRGPVSGSPDSMNASRLSQPGQLMSQPSTASNS<br>LPEPAKKSEEL<br>VAEAHNLCTLLENAIQDTVREQDQSFTALDWSWLQTEEEEHSCLEQAS<br>(huIKK2null(S177A/S181A); P4006 без эпитопной метки) |
| 89 | MSWSPSLPTQTCGAWEMKERLGTGGFGNVIRWHNQATGEQIAIKQCRQELSPKNRNRWCL<br>EIQIMRRLNHPN<br>VVAARDVPEGMQNLAPNDLPLLAMEYCQGGDLRRYLNQFENCCGLREGAVLTLLSDIASA<br>LRYLHENRIIHRDLK<br>PENIVLQQGEKRLIHKIIDLGYAKELDQGELCTEFVGTLQYLAPELLEQQKYTVTVDYWS<br>FGTLAFECITGFRPFLPN |

WQPVQWHSKVRQKSEVDIVVSEDLNGAVKFSSSLPFPNNLNSVLAERLEKWLQLMLMWHP
RQRGTDPQYGP
NGCFRALDDILNLKLVHVLNMVTGTVHTYPVTEDESLQSLKTRIQENTGILETDQELLQK
AGLVLLPDKPATQCISD
SKTNEGLTLDMDLVFLLDNSKINYETQITPRPPPESVSCILQEPKRNLSFFQLRKVWGQV
WHSIQTLKEDCNRLQQ
GQRAAMMSLLRNNSCLSKMKNAMASTAQQLKAKLDFFKTSIQIDLEKYKEQTEFGITSDK
LLLAWREMEQAVEQ
CGRENDVKHLVERMMALQTDIVDLQRSPMGRKQGGTLDDLEEQARELYRKLREKPRDQRT
EGDSQEMVRLLLQ
AIQSFEKKVRVIYTQLSKTVVCKQKALELLPKVEEVVSLMNEDERTVVRLQEKRQKELWN
LLKIACSKVRGPVSGSP
DSMNVSRLSHPGQLMSQPSSACDSLPESDKKSEELVAEAHALCSRLESALQDTVKEQDRS
FTTLDWSWLQMEDEE
RCSLEQACD

(muIKK2ca(S177E/S181E); P4002 без эпитопной метки)

MSWSPSLPTQTCGAWEMKERLGTGGFGNVIRWHNQATGEQIAIKQCRQELSPKNRNRWCLE
IQIMRRLNHPN
VVAARDVPEGMQNLAPNDLPLLAMEYCQGGDLRRYLNQFENCCGLREGAVLTLLSDIASAL
RYLHENRIIHRDLK
PENIVLQQGEKRLIHKIIDLGYAKELDQGALCTAFVGTLQYLAPELLEQQKYTVTVDYWSF
GTLAFECITGFRPFLPN
WQPVQWHSKVRQKSEVDIVVSEDLNGAVKFSSSLPFPNNLNSVLAERLEKWLQLMLMWHPR
QRGTDPQYGP
NGCFRALDDILNLKLVHVLNMVTGTVHTYPVTEDESLQSLKTRIQENTGILETDQELLQKA
GLVLLPDKPATQCISD
SKTNEGLTLDMDLVFLLDNSKINYETQITPRPPPESVSCILQEPKRNLSFFQLRKVWGQVW
HSIQTLKEDCNRLQQ
GQRAAMMSLLRNNSCLSKMKNAMASTAQQLKAKLDFFKTSIQIDLEKYKEQTEFGITSDKL
LLAWREMEQAVEQ
CGRENDVKHLVERMMALQTDIVDLQRSPMGRKQGGTLDDLEEQARELYRKLREKPRDQRTE
GDSQEMVRLLLQ
AIQSFEKKVRVIYTQLSKTVVCKQKALELLPKVEEVVSLMNEDERTVVRLQEKRQKELWNL
LKIACSKVRGPVSGSP
DSMNVSRLSHPGQLMSQPSSACDSLPESDKKSEELVAEAHALCSRLESALQDTVKEQDRSF

| | |
|---|---|
| | TTLDWSWLQMEDEE<br>RCSLEQACD<br>muIKK2null(S177A/S181A); P4003 без эпитопной метки) |
| 91 | MERPPGLRPGAGGPWEMRERLGTGGFGNVCLYQHRELDLKIAIKSCRLELSTKNRER<br>WCHEIQIMKKLNHANVVKACDVPEELNILIHDVPLLAMEYCSGGDLRKLLNKPENCC<br>GLKESQILSLLSDIGSGIRYLHENKIIHRDLKPENIVLQDVGGKIIHKIIDLGYAKD<br>VDQG*E*LCT*E*FVGTLQYLAPELFENKPYTATVDYWSFGTMVFECIAGYRPFLHHLQPF<br>TWHEKIKKKDPKCIFACEEMSGEVRFSSHLPQPNSLCSLVVEPMENWLQLMLNWDPQ<br>QRGGPVDLTLKQPRCFVLMDHILNLKIVHILNMTSAKIISFLLPPDESLHSLQSRIE<br>RETGINTGSQELLSETGISLDPRKPASQCVLDGVRGCDSYMVYLFDKSKTVYEGPFA<br>SRSLSDCVNYIVQDSKIQLPIIQLRKVWAEAVHYVSGLKEDYSRLFQGQRAAMLSLL<br>RYNANLTKMKNTLISASQQLKAKLEFFHKSIQLDLERYSEQMTYGISSEKMLKAWKE<br>MEEKAIHYAEVGVIGYLEDQIMSLHAEIMELQKSPYRRQGDLMESLEQRAIDLYKQL<br>KHRPSDHSYSDSTEMVKIIVHTVQSQDRVLKELFGHLSKLLGCKQKIIDLLPKVEVA<br>LSNIKEADNTVMFMQGKRQKEIWHLLKIACTQ*AAA*RALVG*AA*LEGAVAPQ*AAA*WLPP<br>*AAA*EHDH*A*L*A*CVV*A*PQDGE*AAA*QMIEENLNCLGHL*AA*IIHEANEEQGNSMMNLDWSW<br>LTE<br>Человеческая конститутивно активная IKK-альфа (мутация PEST) P.4013 без эпитопной метки |
| 92 | MERPPGLRPGAGGPWEMRERLGTGGFGNVCLYQHRELDLKIAIKSCRLELSTKNRER<br>WCHEIQIMKKLNHANVVKACDVPEELNILIHDVPLLAMEYCSGGDLRKLLNKPENCC<br>GLKESQILSLLSDIGSGIRYLHENKIIHRDLKPENIVLQDVGGKIIHKIIDLGYAKD<br>VDQG*E*LCT*E*FVGTLQYLAPELFENKPYTATVDYWSFGTMVFECIAGYRPFLHHLQPF<br>TWHEKIKKKDPKCIFACEEMSGEVRFSSHLPQPNSLCSLVVEPMENWLQLMLNWDPQ<br>QRGGPVDLTLKQPRCFVLMDHILNLKIVHILNMTSAKIISFLLPPDESLHSLQSRIE<br>RETGINTGSQELLSETGISLDPRKPASQCVLDGVRGCDSYMVYLFDKSKTVYEGPFA<br>SRSLSDCVNYIVQDSKIQLPIIQLRKVWAEAVHYVSGLKEDYSRLFQGQRAAMLSLL<br>RYNANLTKMKNTLISASQQLKAKLEFFHKSIQLDLERYSEQMTYGISSEKMLKAWKE<br>MEEKAIHYAEVGVIGYLEDQIMSLHAEIMELQKSPYRRQGDLMESLEQRAIDLYKQL<br>KHRPSDHSYSDSTEMVKIIVHTVQSQDRVLKELFGHLSKLLGCKQKIIDLLPKVEVA<br>LSNIKEADNTVMFMQGKRQKEIWHLLKIACTQ*AAA*RALVG*AA*LEGAVAPQ*AAA*WLPP<br>*AAA*EHDH*A*L*A*CVV*A*PQDGE*AAA*QMIEENLNCLGHL*AA*IIHEANEEQGNSMMNLDWSW<br>LTE<br>Человеческая конститутивно активная IKK-альфа (мутация PEST) P.4014 без эпитопной метки |

| | |
|---|---|
| 93 | MSWSPSLTTQTCGAWEMKERLGTGGFGNVIRWHNQETGEQIAIKQCRQELSPRNRER<br>WCLEIQIMRRLTHPNVVAARDVPEGMQNLAPNDLPLLAMEYCQGGDLRKYLNQFENC<br>CGLREGAILTLLSDIASALRYLHENRIIHRDLKPENIVLQQGEQRLIHKIIDLGYAK<br>ELDQG*E*LCT*E*FVGTLQYLAPELLEQQKYTVTVDYWSFGTLAFECITGFRPFLPNWQP<br>VQWHSKVRQKSEVDIVVSEDLNGTVKFSSSLPYPNNLNSVLAERLEKWLQLMLMWHP<br>RQRGTDPTYGPNGCFKALDDILNLKLVHILNMVTGTIHTYPVTEDESLQSLKARIQQ<br>DTGIPEEDQELLQEAGLALIPDKPATQCISDGKLNEGHTLDMDLVFLFDNSKITYET<br>QISPRPQPESVSCILQEPKRNLAFFQLRKVWGQVWHSIQTLKEDCNRLQQGQRAAMM<br>NLLRNNSCLSKMKNSMASMSQQLKAKLDFFKTSIQIDLEKYSEQTEFGITSDKLLLA<br>WREMEQAVELCGRENEVKLLVERMMALQTDIVDLQRSPMGRKQGGTLDDLEEQAREL<br>YRRLREKPRDQRTEGDSQEMVRLLLQAIQSFEKKVRVIYTQLSKTVVCKQKALELLP<br>KVEEVVSLMNEDEKTVVRLQEKRQKELWNLLKIACSKVRGPV*A*GAPD*A*MNA*A*RL*A*QP<br>GQLM*A*QP*A*TA*A*N*A*LPEPAKK*A*EELVAEAHNLCTLLENAIQDTVREQDQSFTALDWSW<br>LQTEEEEHSCLEQAS<br>Человеческая конститутивно активная IKK-бета (мутация PEST) P.4015 без эпитопной метки |
| 94 | MSWSPSLTTQTCGAWEMKERLGTGGFGNVIRWHNQETGEQIAIKQCRQELSPRNRER<br>WCLEIQIMRRLTHPNVVAARDVPEGMQNLAPNDLPLLAMEYCQGGDLRKYLNQFENC<br>CGLREGAILTLLSDIASALRYLHENRIIHRDLKPENIVLQQGEQRLIHKIIDLGYAK<br>ELDQG*E*LCT*E*FVGTLQYLAPELLEQQKYTVTVDYWSFGTLAFECITGFRPFLPNWQP<br>VQWHSKVRQKSEVDIVVSEDLNGTVKFSSSLPYPNNLNSVLAERLEKWLQLMLMWHP<br>RQRGTDPTYGPNGCFKALDDILNLKLVHILNMVTGTIHTYPVTEDESLQSLKARIQQ<br>DTGIPEEDQELLQEAGLALIPDKPATQCISDGKLNEGHTLDMDLVFLFDNSKITYET<br>QISPRPQPESVSCILQEPKRNLAFFQLRKVWGQVWHSIQTLKEDCNRLQQGQRAAMM<br>NLLRNNSCLSKMKNSMASMSQQLKAKLDFFKTSIQIDLEKYSEQTEFGITSDKLLLA<br>WREMEQAVELCGRENEVKLLVERMMALQTDIVDLQRSPMGRKQGGTLDDLEEQAREL<br>YRRLREKPRDQRTEGDSQEMVRLLLQAIQSFEKKVRVIYTQLSKTVVCKQKALELLP<br>KVEEVVSLMNEDEKTVVRLQEKRQKELWNLLKIACSKVRGPV*A*GAPD*A*MNA*A*RL*A*QP<br>GQLM*A*QP*A*TA*A*N*A*LPEPAKK*A*EELVAEAHNLCTLLENAIQDTVREQDQSFTALDWSW<br>LQTEEEEHSCLEQAS<br>Человеческая конститутивно активная IKK-бета (мутация PEST) P.4016 без эпитопной метки |
| 95 | MERPPGLRPGAGGPWEMRERLGTGGFGNVSLYQHRELDLKIAIKSCRLELSSKNRER<br>WCHEIQIMKKLDHANVVKACDVPEELNFLINDVPLLAMEYCSGGDLRKLLNKPENCC<br>GLKESQILSLLSDIGSGIRYLHENKIIHRDLKPENIVLQDVGGKTIHKIIDLGYAKD |

| | |
|---|---|
| | VDQG*E*LCT*E*FVGTLQYLAPELFENKPYTATVDYWSFGTMVFECIAGYRPFLHHLQPF<br>TWHEKIKKKDPKCIFACEEMTGEVRFSSHLPQPNSLCSLIVEPMESWLQLMLNWDPQ<br>QRGGPIDLTLKQPRCFALMDHILNLKIVHILNMTSAKIISFLLPCDESLHSLQSRIE<br>RETGINTGSQELLSETGISLDPRKPASQCVLDGVRGCDSYMVYLFDKSKTVYEGPFA<br>SRSLSDCVNYIVQDSKIQLPIIQLRKVWAEAVHYVSGLKEDYSRLFQGQRAAMLSLL<br>RYNANLTKMKNTLISASQQLKAKLEFFRKSIQLDLERYSEQMTYGISSEKMLKAWKE<br>MEEKAIHYSEVGVIGYLEDQIMSLHTEIMELQKSPYGRRQGDLMESLEQRAIDLYKQ<br>LKHRPPDHLYSDSTEMVKIIVHTVQSQDRVLKELFGHLSKLLGCKQKIIDLLPKVEV<br>ALSNIKEADNTVMFMQGKRQKEIWHLLKIACTQ*AAARALVGAALEGAVAPPVAAWLP*<br>P*A*LADREHPLTCVV*A*PQDGE*A*LAQMIEENLNCLGHL*AA*IIRE*A*NEDQSSSLMSLDWS<br>WLAE<br>Мышиная конститутивно активная IKK-альфа (мутация PEST) P.4017 без эпитопной метки |
| 96 | MERPPGLRPGAGGPWEMRERLGTGGFGNVSLYQHRELDLKIAIKSCRLELSSKNRER<br>WCHEIQIMKKLDHANVVKACDVPEELNFLINDVPLLAMEYCSGGDLRKLLNKPENCC<br>GLKESQILSLLSDIGSGIRYLHENKIIHRDLKPENIVLQDVGGKTIHKIIDLGYAKD<br>VDQG*E*LCT*E*FVGTLQYLAPELFENKPYTATVDYWSFGTMVFECIAGYRPFLHHLQPF<br>TWHEKIKKKDPKCIFACEEMTGEVRFSSHLPQPNSLCSLIVEPMESWLQLMLNWDPQ<br>QRGGPIDLTLKQPRCFALMDHILNLKIVHILNMTSAKIISFLLPCDESLHSLQSRIE<br>RETGINTGSQELLSETGISLDPRKPASQCVLDGVRGCDSYMVYLFDKSKTVYEGPFA<br>SRSLSDCVNYIVQDSKIQLPIIQLRKVWAEAVHYVSGLKEDYSRLFQGQRAAMLSLL<br>RYNANLTKMKNTLISASQQLKAKLEFFRKSIQLDLERYSEQMTYGISSEKMLKAWKE<br>MEEKAIHYSEVGVIGYLEDQIMSLHTEIMELQKSPYGRRQGDLMESLEQRAIDLYKQ<br>LKHRPPDHLYSDSTEMVKIIVHTVQSQDRVLKELFGHLSKLLGCKQKIIDLLPKVEV<br>ALSNIKEADNTVMFMQGKRQKEIWHLLKIACTQ*AAARALVGAALEGAVAPPVAAWLP*<br>P*A*LADREHPLTCVV*A*PQDGE*A*LAQMIEENLNCLGHL*AA*IIRE*A*NEDQSSSLMSLDWS<br>WLAE<br>Мышиная конститутивно активная IKK-альфа (мутация PEST) P.4018 без эпитопной метки |
| 97 | MSWSPSLPTQTCGAWEMKERLGTGGFGNVIRWHNQATGEQIAIKQCRQELSPKNRNR<br>WCLEIQIMRRLNHPNVVAARDVPEGMQNLAPNDLPLLAMEYCQGGDLRRYLNQFENC<br>CGLREGAVLTLLSDIASALRYLHENRIIHRDLKPENIVLQQGEKRLIHKIIDLGYAK<br>ELDQG*E*LCT*E*FVGTLQYLAPELLEQQKYTVTVDYWSFGTLAFECITGFRPFLPNWQP<br>VQWHSKVRQKSEVDIVVSEDLNGAVKFSSSLPFPNNLNSVLAERLEKWLQLMLMWHP<br>RQRGTDPQYGPNGCFRALDDILNLKLVHVLNMVTGTVHTYPVTEDESLQSLKTRIQE |

| | |
|---|---|
| | NTGILETDQELLQKAGLVLLPDKPATQCISDSKTNEGLTLDMDLVFLLDNSKINYET<br>QITPRPPPESVSCILQEPKRNLSFFQLRKVWGQVWHSIQTLKEDCNRLQQGQRAAMM<br>SLLRNNSCLSKMKNAMASTAQQLKAKLDFFKTSIQIDLEKYKEQTEFGITSDKLLLA<br>WREMEQAVEQCGRENDVKHLVERMMALQTDIVDLQRSPMGRKQGGTLDDLEEQAREL<br>YRKLREKPRDQRTEGDSQEMVRLLLQAIQSFEKKVRVIYTQLSKTVVCKQKALELLP<br>KVEEVVSLMNEDERTVVRLQEKRQKELWNLLKIACSKVRGPV*A*G*A*PD*A*MNV*A*RL*A*HP<br>GQLM*A*QP*A*SACDALPESDKK*A*EELVAEAHALCSRLESALQDTVKEQDRSFTTLDWSW<br>LQMEDEERCSLEQACD<br>Мышиная конститутивно активная IKK-бета (мутация PEST) P.4019 без эпитопной метки |
| 98 | MSWSPSLPTQTCGAWEMKERLGTGGFGNVIRWHNQATGEQIAIKQCRQELSPKNRNR<br>WCLEIQIMRRLNHPNVVAARDVPEGMQNLAPNDLPLLAMEYCQGGDLRRYLNQFENC<br>CGLREGAVLTLLSDIASALRYLHENRIIHRDLKPENIVLQQGEKRLIHKIIDLGYAK<br>ELDQG*Æ*LCT*E*FVGTLQYLAPELLEQQKYTVTVDYWSFGTLAFECITGFRPFLPNWQP<br>VQWHSKVRQKSEVDIVVSEDLNGAVKFSSSLPFPNNLNSVLAERLEKWLQLMLMWHP<br>RQRGTDPQYGPNGCFRALDDILNLKLVHVLNMVTGTVHTYPVTEDESLQSLKTRIQE<br>NTGILETDQELLQKAGLVLLPDKPATQCISDSKTNEGLTLDMDLVFLLDNSKINYET<br>QITPRPPPESVSCILQEPKRNLSFFQLRKVWGQVWHSIQTLKEDCNRLQQGQRAAMM<br>SLLRNNSCLSKMKNAMASTAQQLKAKLDFFKTSIQIDLEKYKEQTEFGITSDKLLLA<br>WREMEQAVEQCGRENDVKHLVERMMALQTDIVDLQRSPMGRKQGGTLDDLEEQAREL<br>YRKLREKPRDQRTEGDSQEMVRLLLQAIQSFEKKVRVIYTQLSKTVVCKQKALELLP<br>KVEEVVSLMNEDERTVVRLQEKRQKELWNLLKIACSKVRGPV*A*G*A*PD*A*MNV*A*RL*A*HP<br>GQLM*A*QP*A*SACDALPESDKK*A*EELVAEAHALCSRLESALQDTVKEQDRSFTTLDWSW<br>LQMEDEERCSLEQACD<br>Мышиная конститутивно активная IKK-бета (мутация PEST) P.4020 без эпитопной метки |
| 99 | MQPDMSLNVIKMKSSDFLESAELDSGGFGKVSLCFHRTQGLMIMKTVYKGPNCIEHN<br>EALLEEAKMMNRLRHSRVVKLLGVIIEEGKYSLVMEYMEKGNLMHVLKAEMSTPLSV<br>KGRIILEIIEGMCYLHGKGVIHKDLKPENILVDNDFHIKIADLGLASFKMWSKLNNE<br>EHNELREVDGTAKKNGGTLYYMAPEHLNDVNAKPTEKSDVYSFAVVLWAIFANKEPY<br>ENAICEQQLIMCIKSGNRPDVDDITEYCPREIISLMKLCWEANPEARPTFPGIEEKF<br>RPFYLSQLEESVEEDVKSLKKEYSNENAVVKRMQSLQLDCVAVPSSRSNSATEQPGS<br>LHSSQGLGMGPVEESWFAPSLEHPQEENEPSLQSKLQDEANYHLYGSRMDRQTKQQP<br>RQNVAYNREEERRRRVSHDPFAQQRPYENFQNTEGKGTAYSSAASHGNAVHQPSGLT<br>SQPQVLYQNNGLYSSHGFGTRPLDPGTAGPRVWYRPIPSHMPSLHNIPVPETNYLGN |

| | |
|---|---|
| | TPTMPFSSLPPTDESIKYTIYNSTGIQIGAYNYMEIGGTSSSGGIKKEIEAIKKEQE<br>AIKKKIEAIEKEIEA<br>(huRIPK1(1-555).IZ.TM; TH1021 без эпитопной метки) |
| 100 | MQPDMSLNVIKMKSSDFLESAELDSGGFGKVSLCFHRTQGLMIMKTVYKGPNCIEHN<br>EALLEEAKMMNRLRHSRVVKLLGVIIEEGKYSLVMEYMEKGNLMHVLKAEMSTPLSV<br>KGRIILEIIEGMCYLHGKGVIHKDLKPENILVDNDFHIKIADLGLASFKMWSKLNNE<br>EHNELREVDGTAKKNGGTLYYMAPEHLNDVNAKPTEKSDVYSFAVVLWAIFANKEPY<br>ENAICEQQLIMCIKSGNRPDVDDITEYCPREIISLMKLCWEANPEARPTFPGIEEKF<br>RPFYLSQLEESVEEDVKSLKKEYSNENAVVKRMQSLQLDCVAVPSSRSNSATEQPGS<br>LHSSQGLGMGPVEESWFAPSLEHPQEENEPSLQSKLQDEANYHLYGSRMDRQTKQQP<br>RQNVAYNREEERRRRVSHDPFAQQRPYENFQNTEGKGTAYSSAASHGNAVHQPSGLT<br>SQPQVLYQNNGLYSSHGFGTRPLDPGTAGPRVWYRPIPSHMPSLHNIPVPETNYLGN<br>TPTMPFSSLPPTDESIKYTIYNSTGIQIGAYNYMEIGGTSSSGSDGSGSGSGSITIR<br>AAFLEKENTALRTEIAELEKEVGRCENIVSKYETRYGPL<br>(huRIPK1(1-555).EE.DM; TH1022 без эпитопной метки) |
| 101 | MQPDMSLNVIKMKSSDFLESAELDSGGFGKVSLCFHRTQGLMIMKTVYKGPNCIEHN<br>EALLEEAKMMNRLRHSRVVKLLGVIIEEGKYSLVMEYMEKGNLMHVLKAEMSTPLSV<br>KGRIILEIIEGMCYLHGKGVIHKDLKPENILVDNDFHIKIADLGLASFKMWSKLNNE<br>EHNELREVDGTAKKNGGTLYYMAPEHLNDVNAKPTEKSDVYSFAVVLWAIFANKEPY<br>ENAICEQQLIMCIKSGNRPDVDDITEYCPREIISLMKLCWEANPEARPTFPGIEEKF<br>RPFYLSQLEESVEEDVKSLKKEYSNENAVVKRMQSLQLDCVAVPSSRSNSATEQPGS<br>LHSSQGLGMGPVEESWFAPSLEHPQEENEPSLQSKLQDEANYHLYGSRMDRQTKQQP<br>RQNVAYNREEERRRRVSHDPFAQQRPYENFQNTEGKGTAYSSAASHGNAVHQPSGLT<br>SQPQVLYQNNGLYSSHGFGTRPLDPGTAGPRVWYRPIPSHMPSLHNIPVPETNYLGN<br>TPTMPFSSLPPTDESIKYTIYNSTGIQIGAYNYMEIGGTSSSGSDGSGSGSGSLEIR<br>AAFLEKENTALRTRAAELRKRVGRCRNIVSKYETRYGPL<br>(huRIPK1(1-555).RR.DM; TH1023 без эпитопной метки) |
| 102 | MQPDMSLDNIKMASSDLLEKTDLDSGGFGKVSLCYHRSHGFVILKKVYTGPNRAEYN<br>EVLLEEGKMMHRLRHSRVVKLLGIIIEEGNYSLVMEYMEKGNLMHVLKTQIDVPLSL<br>KGRIIVEAIEGMCYLHDKGVIHKDLKPENILVDRDFHIKIADLGVASFKTWSKLTKE<br>KDNKQKEVSSTTKKNNGGTLYYMAPEHLNDINAKPTEKSDVYSFGIVLWAIFAKKEP<br>YENVICTEQFVICIKSGNRPNVEEILEYCPREIISLMERCWQAIPEDRPTFLGIEEE<br>FRPFYLSHFEEYVEEDVASLKKEYPDQSPVLQRMFSLQHDCVPLPPSRSNSEQPGSL<br>HSSQGLQMGPVEESWFSSSPEYPQDENDRSVQAKLQEEASYHAFGIFAEKQTKPQPR<br>QNEAYNREEERKRRVSHDPFAQQRARENIKSAGARGHSDPSTTSRGIAVQQLSWPAT |

| | |
|---|---|
| | QTVWNNGLYNQHGFGTTGTGVWYPPNLSQMYSTYKTPVPETNIPGSTPTMPYFSGPV<br>ADDLIKYTIFNSSGIQIGNHNYMDVGLNSQPPNNTCKEESTSGGIKKEIEAIKKEQE<br>AIKKKIEAIEKEIEA<br>(msRIPK1(1-555).IZ.TM; TH1024 без эпитопной метки) |
| 103 | MQPDMSLDNIKMASSDLLEKTDLDSGGFGKVSLCYHRSHGFVILKKVYTGPNRAEYN<br>EVLLEEGKMMHRLRHSRVVKLLGIIIEEGNYSLVMEYMEKGNLMHVLKTQIDVPLSL<br>KGRIIVEAIEGMCYLHDKGVIHKDLKPENILVDRDFHIKIADLGVASFKTWSKLTKE<br>KDNKQKEVSSTTKKNNGGTLYYMAPEHLNDINAKPTEKSDVYSFGIVLWAIFAKKEP<br>YENVICTEQFVICIKSGNRPNVEEILEYCPREIISLMERCWQAIPEDRPTFLGIEEE<br>FRPFYLSHFEEYVEEDVASLKKEYPDQSPVLQRMFSLQHDCVPLPPSRSNSEQPGSL<br>HSSQGLQMGPVEESWFSSSPEYPQDENDRSVQAKLQEEASYHAFGIFAEKQTKPQPR<br>QNEAYNREEERKRRVSHDPFAQQRARENIKSAGARGHSDPSTTSRGIAVQQLSWPAT<br>QTVWNNGLYNQHGFGTTGTGVWYPPNLSQMYSTYKTPVPETNIPGSTPTMPYFSGPV<br>ADDLIKYTIFNSSGIQIGNHNYMDVGLNSQPPNNTCKEESTSGSDGSGSGSGSITIR<br>AAFLEKENTALRTEIAELEKEVGRCENIVSKYETRYGPL<br>(msRIPK1(1-555).EE.DM; TH1025 без эпитопной метки) |
| 104 | MQPDMSLDNIKMASSDLLEKTDLDSGGFGKVSLCYHRSHGFVILKKVYTGPNRAEYN<br>EVLLEEGKMMHRLRHSRVVKLLGIIIEEGNYSLVMEYMEKGNLMHVLKTQIDVPLSL<br>KGRIIVEAIEGMCYLHDKGVIHKDLKPENILVDRDFHIKIADLGVASFKTWSKLTKE<br>KDNKQKEVSSTTKKNNGGTLYYMAPEHLNDINAKPTEKSDVYSFGIVLWAIFAKKEP<br>YENVICTEQFVICIKSGNRPNVEEILEYCPREIISLMERCWQAIPEDRPTFLGIEEE<br>FRPFYLSHFEEYVEEDVASLKKEYPDQSPVLQRMFSLQHDCVPLPPSRSNSEQPGSL<br>HSSQGLQMGPVEESWFSSSPEYPQDENDRSVQAKLQEEASYHAFGIFAEKQTKPQPR<br>QNEAYNREEERKRRVSHDPFAQQRARENIKSAGARGHSDPSTTSRGIAVQQLSWPAT<br>QTVWNNGLYNQHGFGTTGTGVWYPPNLSQMYSTYKTPVPETNIPGSTPTMPYFSGPV<br>ADDLIKYTIFNSSGIQIGNHNYMDVGLNSQPPNNTCKEESTSGSDGSGSGSGSLEIR<br>AAFLEKENTALRTRAAELRKRVGRCRNIVSKYETRYGPL<br>(msRIPK1(1-555).RR.DM; TH1026 без эпитопной метки) |
| 105 | MSTASAASSSSSSSAGEMIEAPSQVLNFEEIDYKEIEVEEVVGRGAFGVVCKAKWRA<br>KDVAIKQIESESERKAFIVELRQLSRVNHPNIVKLYGACLNPVCLVMEYAEGGSLYN<br>VLHGAEPLPYYTAAHAMSWCLQCSQGVAYLHSMQPKALIHRDLKPPNLLLVAGGTVL<br>KICDFGTACDIQTHMTNNKGSAAWMAPEVFEGSNYSEKCDVFSWGIILWEVITRRKP<br>FDEIGGPAFRIMWAVHNGTRPPLIKNLPKPIESLMTRCWSKDPSQRPSMEEIVKIMT<br>HLMRYFPGADEPLQYPCQEFGGGGGQSPTLTLQSTNTHTQSSSSSSDGGLFRSRPAH<br>SLPPGEDGRVEPYVDFAEFYRLWSVDHGEQSVVTAP |

| | |
|---|---|
| | (человеческий TAK1-TAB1; P4031 без эпитопной метки) |
| 106 | MAALKSWLSRSVTSFFRYRQCLCVPVVANFKKRCFSELIRPWHKTVTIGFGVTLCAV PIAQKSEPHSLSSEALMRRAVSLVTDSTSTFLSQTTYALIEAITEYTKAVYTLTSLY RQYTSLLGKMNSEEEDEVWQVIIGARAEMTSKHQEYLKLETTWMTAVGLSEMAAEAA YQTGADQASITARNHIQLVKLQVEEVHQLSRKAETKLAEAQIEELRQKTQEEGEERA ESEQEAYLRED<br>(Diablo.1; без эпитопной метки) |
| 107 | MAALKSWLSRSVTSFFRYRQCLCVPVVANFKKRCFSELIRPWHKTVTIGFGVTLCAV PIAQKSEPHSLSSEALMRRAVSLVTDSTSTFLSQTTYALIEAITEYTKAVYTLTSLY RQYTSLLGKMNLEEEDEVWQVIIGARAEMTSKHQEYLKLETTWMTAVGLSEMAAEAA YQTGADQASITARNHIQLVKLQVEEVHQLSRKAETKLAEAQIEELRQKTQEEGEERA ESEQEAYLRED<br>(Diablo.1(S126L); без эпитопной метки) |
| 108 | MAVPIAQKSEPHSLSSEALMRRAVSLVTDSTSTFLSQTTYALIEAITEYTKAVYTLT SLYRQYTSLLGKMNSEEEDEVWQVIIGARAEMTSKHQEYLKLETTWMTAVGLSEMAA EAAYQTGADQASITARNHIQLVKLQVEEVHQLSRKAETKLAEAQIEELRQKTQEEGE ERAESEQEAYLRED<br>(Diablo.1(56-239); без эпитопной метки) |
| 109 | MAVPIAQKSEPHSLSSEALMRRAVSLVTDSTSTFLSQTTYALIEAITEYTKAVYTLT SLYRQYTSLLGKMNLEEEDEVWQVIIGARAEMTSKHQEYLKLETTWMTAVGLSEMAA EAAYQTGADQASITARNHIQLVKLQVEEVHQLSRKAETKLAEAQIEELRQKTQEEGE ERAESEQEAYLRED<br>(Diablo.1(56-239/S126L); без эпитопной метки) |
| 110 | MAALKSWLSRSVTSFFRYRQCLCVPVVANFKKRCFSELIRPWHKTVTIGFGVTLCAV PIAQAVYTLTSLYRQYTSLLGKMNSEEEDEVWQVIIGARAEMTSKHQEYLKLETTWM TAVGLSEMAAEAAYQTGADQASITARNHIQLVKLQVEEVHQLSRKAETKLAEAQIEE LRQKTQEEGEERAESEQEAYLRED<br>(Diablo.3; TH2003 без эпитопной метки) |
| 111 | MAALKSWLSRSVTSFFRYRQCLCVPVVANFKKRCFSELIRPWHKTVTIGFGVTLCAV PIAQAVYTLTSLYRQYTSLLGKMNLEEEDEVWQVIIGARAEMTSKHQEYLKLETTWM TAVGLSEMAAEAAYQTGADQASITARNHIQLVKLQVEEVHQLSRKAETKLAEAQIEE LRQKTQEEGEERAESEQEAYLRED<br>(Diablo.3(S82L); TH2001 без эпитопной метки) |
| 112 | MAVPIAQAVYTLTSLYRQYTSLLGKMNSEEEDEVWQVIIGARAEMTSKHQEYLKLET TWMTAVGLSEMAAEAAYQTGADQASITARNHIQLVKLQVEEVHQLSRKAETKLAEAQ IEELRQKTQEEGEERAESEQEAYLRED<br>(Diablo.3(56-195); TH2002 без эпитопной метки) |
| 113 | MAVPIAQAVYTLTSLYRQYTSLLGKMNLEEEDEVWQVIIGARAEMTSKHQEYLKLET |

| | |
|---|---|
| | TWMTAVGLSEMAAEAAYQTGADQASITARNHIQLVKLQVEEVHQLSRKAETKLAEAQ<br>IEELRQKTQEEGEERAESEQEAYLRED<br>(Diablo.3(56-195/S82L); без эпитопной метки) |
| 114 | MAAVILESIFLKRSQQKKKTSPLNFKKRLFLLTVHKLSYYKYDFERGRRGSKKGSID<br>VEKITCVETVVPEKNPPPERQIPRRGEESSEMEQISIIERFPYPFQVVYDEGPLYVF<br>SPTEELRKRWIHQLKNVIRYNSDLVQKYHPCFWIDGQYLCCSQTAKNAMGCQILENR<br>NGSLKPGSSHRKTKKPLPPTPEEDQILKKPLPPEPAAAPVSTSELKKVVALYDYMPM<br>NANDLQLRKGDEYFILEESNLPWWRARDKNGQEGYIPSNYVTEAEDSIEMYEWYSKH<br>MTRSQAEQLLKQEGKEGGFIVRDSSKAGKYTVSVFAKSTGDPQGVIRHYVVCSTPQS<br>QYYLAEKHLFSTIPELINYHQHNSAGLISRLKYPVSQQNKNAPSTAGLGYGSWEIDP<br>KDLTFLKELGTGQFGVVKYGKWRGQYDVAIKMIKEGSMSEDEFIEEAKVMMNLSHEK<br>LVQLYGVCTKQRPIFIITEYMANGCLLNYLREMRHRFQTQQLLEMCKDVCEAMEYLE<br>SKQFLHRDLAARNCLVNDQGVVKVSDFGLSRYVLDDEYTSSVGSKFPVRWSPPEVLM<br>YSKFSSKSDIWAFGVLMWEIYSLGKMPYERFTNSETAEHIAQGLRLYRPHLASEKVY<br>TIMYSCWHEKADERPTFKILLSNILDVMDEES<br>(Btk(E41K); P4029 без эпитопной метки) |
| 115 | MVTHSKFPAAGMSRPLDTSLRLKTFSSKSEYQLVVNAVRKLQESGFYWSAVTGGEAN<br>LLLSAEPAGTFLIRDSSDQRHFFTLSVKTQSGTKNLRIQCEGGSFSLQSDPRSTQPV<br>PRFDCVLKLVHHYMPPPGAPSFPSPPTEPSSEVPEQPSAQPLPGSPPRRAYYIYSGG<br>EKIPLVLSRPLSSNVATLQHLCRKTVNGHLDSYEKVTQLPGPIREFLDQYDAPL<br>(SOCS3; P4030 без эпитопной метки) |
| 116 | MRMKQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEADQTSGNYLNMQDSQGVLSSFPAP<br>QAVQDNPAMPTSSGSEGNVKLCSLEEAQRIWKQKSAEIYPIMDKSSRTRLALIICNE<br>EFDSIPRRTGAEVDITGMTMLLQNLGYSVDVKKNLTASDMTTELEAFAHRPEHKTSD<br>STFLVFMSHGIREGICGKKHSEQVPDILQLNAIFNMLNTKNCPSLKDKPKVIIIQAC<br>RGDSPGVVWFKDSVGVSGNLSLPTTEEFEDDAIKKAHIEKDFIAFCSSTPDNVSWRH<br>PTMGSVFIGRLIEHMQEYACSCDVEEIFRKVRFSFEQPDGRAQMPTTERVTLTRCFY<br>LFPGH<br>(IZ_hsCASP1 (самоактивирующаяся человеческая каспаза 1);<br>P2024 без эпитопной метки) |
| 117 | MRMKQLEDKIEELLSKIYHLENEIARLKKLIGEADQTSGNYLNMQDSQGVLSSFPAP<br>QAVQDNPAMPTSSGSEGNVKLCSLEEAQRIWKQKSAEIYPIMDKSSRTRLALIICNE<br>EFDSIPRRTGAEVDITGMTMLLQNLGYSVDVKKNLTASDMTTELEAFAHRPEHKTSD<br>STFLVFMSHGIREGICGKKHSEQVPDILQLNAIFNMLNTKNCPSLKDKPKVIIIQAC<br>RGDSPGVVWFKDSVGVSGNLSLPTTEEFEDDAIKKAHIEKDFIAFCSSTPDNVSWRH |

| | |
|---|---|
| | PTMGSVFIGRLIEHMQEYACSCDVEEIFRKVRFSFEQPDGRAQMPTTERVTLTRCFY LFPGH (DM_hsCASP1 (самоактивирующаяся человеческая каспаза 1); P2025 без эпитопной метки) |
| 118 | MRMKQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGERSAPSAETFVATEDSKGGHPSSSE TKEEQNKEDGTFPGLTGTLKFCPLEKAQKLWKENPSEIYPIMNTTTRTRLALIICNT EFQHLSPRVGAQVDLREMKLLLEDLGYTVKVKENLTALEMVKEVKEFAACPEHKTSD STFLVFMSHGIQEGICGTTYSNEVSDILKVDTIFQMMNTLKCPSLKDKPKVIIIQAC RGEKQGVVLLKDSVRDSEEDFLTDAIFEDDGIKKAHIEKDFIAFCSSTPDNVSWRHP VRGSLFIESLIKHMKEYAWSCDLEDIFRKVRFSFEQPEFRLQMPTADRVTLTKRFYL FPGH (IZ_mmCASP1 (самоактивирующаяся мышиная каспаза 1); P2026 без эпитопной метки) |
| 119 | MRMKQLEDKIEELLSKIYHLENEIARLKKLIGERSAPSAETFVATEDSKGGHPSSSE TKEEQNKEDGTFPGLTGTLKFCPLEKAQKLWKENPSEIYPIMNTTTRTRLALIICNT EFQHLSPRVGAQVDLREMKLLLEDLGYTVKVKENLTALEMVKEVKEFAACPEHKTSD STFLVFMSHGIQEGICGTTYSNEVSDILKVDTIFQMMNTLKCPSLKDKPKVIIIQAC RGEKQGVVLLKDSVRDSEEDFLTDAIFEDDGIKKAHIEKDFIAFCSSTPDNVSWRHP VRGSLFIESLIKHMKEYAWSCDLEDIFRKVRFSFEQPEFRLQMPTADRVTLTKRFYL FPGH (DM_mmCASP1 (самоактивирующаяся мышиная каспаза 1); P2027 без эпитопной метки) |
| 120 | MHHHHHHHHHHGKPIPNPLLGLDSTGIPVHLELASMTNMELMSSIVHQQVFPTEAGQ SLVISASIIVFNLLELEGDYRGRVLELFRAAQLANDVVLQIMELCGATR (Конкатемер ADR с меткой HIS) |
| 121 | VVGADGVGK (KRAS G12D 9mer) |
| 122 | VVGAVGVGK (KRAS G12V 9mer) |
| 123 | VGAGDVGKS (KRAS G13D 9mer) |
| 124 | VVGACGVGK (KRAS G12C 9mer) |
| 125 | MKLVVVGACGVGKSA (KRAS G12C 15mer) |

| | |
|---|---|
| 126 | ATGACCGAGTACAAGCTGGTGGTGGTGGGCGCCGACGGCGTGGGCAAGAGCGCCCTG<br>ACCATCCAGCTGATCCAG<br>(Нуклеотидная последовательность KRAS G12D 25mer) |
| 127 | ATGACCGAGTACAAGCTGGTGGTGGTGGGCGCCGTGGGCGTGGGCAAGAGCGCCCTG<br>ACCATCCAGCTGATCCAG<br>(Нуклеотидная последовательность KRAS G12V 25mer) |
| 128 | ATGACCGAGTACAAGCTGGTGGTGGTGGGCGCCGGCGACGTGGGCAAGAGCGCCCTG<br>ACCATCCAGCTGATCCAG<br>(Нуклеотидная последовательность KRAS G13D 25mer) |
| 129 | ATGACCGAGTACAAGTTAGTGGTTGTGGGCGCCGACGGCGTGGGCAAGAGCGCCCTC<br>ACCATCCAGCTTATCCAGATGACGGAATATAAGTTAGTAGTAGTGGGAGCCGACGGT<br>GTCGGCAAGTCCGCTTTGACCATTCAACTTATTCAGATGACAGAGTATAAGCTGGTC<br>GTTGTAGGCGCAGACGGCGTTGGAAAGTCGGCACTGACGATCCAGTTGATCCAG<br>(Нуклеотидная последовательность KRAS G12D 25mer^3) |
| 130 | ATGACCGAGTACAAGCTCGTCGTGGTGGGCGCCGTGGGCGTGGGCAAGAGCGCCCTA<br>ACCATCCAGTTGATCCAGATGACCGAATATAAGCTCGTGGTAGTCGGAGCGGTGGGC<br>GTTGGCAAGTCAGCGCTAACAATACAACTAATCCAAATGACCGAATACAAGCTAGTT<br>GTAGTCGGTGCCGTCGGCGTTGGAAAGTCAGCCCTTACAATTCAGCTCATTCAG<br>(Нуклеотидная последовательность KRAS G12V 25mer^3) |
| 131 | ATGACCGAGTACAAGCTCGTAGTGGTTGGCGCCGGCGACGTGGGCAAGAGCGCCCTA<br>ACCATCCAGCTCATCCAGATGACAGAATATAAGCTTGTGGTTGTGGGAGCAGGAGAC<br>GTGGGAAAGAGTGCGTTGACGATTCAACTCATACAGATGACCGAATACAAGTTGGTG<br>GTGGTCGGCGCAGGTGACGTTGGTAAGTCTGCACTAACTATACAACTGATCCAG<br>(Нуклеотидная последовательность KRAS G13D 25mer^3) |
| 132 | ATGACCGAGTACAAGCTGGTGGTGGTGGGCGCCTGCGGCGTGGGCAAGAGCGCCCTG<br>ACCATCCAGCTGATCCAG<br>(Нуклеотидная последовательность KRAS G12C 25mer) |
| | |
| 133 | ATGACCGAGTACAAGCTGGTGGTGGTGGGCGCCGGCGGCGTGGGCAAGAGCGCCCTG<br>ACCATCCAGCTGATCCAG<br>(Нуклеотидная последовательность KRAS WT 25mer) |
| 134 | GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACC<br>(последовательность 5′-HTO; без промотора) |
| 135 | MTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQMTEYKLV<br>VVGAGDVGKSALTIQLIQ |

| | |
|---|---|
| | (аминокислотная последовательность KRAS(G12D G12V G13D) 75mer “3MUT”) |
| 136 | ATGACCGAGTACAAGCTCGTTGTAGTCGGCGCCGACGGCGTGGGCAAGAGCGCCTTG<br>ACCATCCAGTTGATCCAGATGACCGAATATAAGTTGGTGGTGGTAGGCGCAGTGGGA<br>GTTGGCAAGTCAGCACTCACAATTCAGCTCATTCAAATGACAGAATACAAGTTAGTC<br>GTTGTAGGAGCAGGCGACGTCGGCAAGAGTGCCTTAACCATTCAACTAATCCAG<br>(нуклеотидная последовательность KRAS(G12D G12V G13D) 75mer “3MUT”) |
| 137 | MTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQMTEYKLV<br>VVGAGDVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQ<br>(аминокислотная последовательность KRAS(G12D G12V G13D G12C) 100mer “4MUT”) |
| 138 | ATGACCGAGTACAAGCTCGTGGTCGTCGGCGCCGACGGGGTAGGCAAGTCCGCTCTG<br>ACCATTCAGCTCATCCAGATGACGGAGTACAAACTCGTGGTAGTGGGAGCCGTGGGT<br>GTGGGCAAGAGCGCGCTCACCATCCAACTCATCCAAATGACCGAATATAAACTCGTC<br>GTGGTGGGAGCCGGCGACGTGGGAAAGAGCGCCCTTACCATCCAGTTAATCCAGATG<br>ACAGAATACAAGCTGGTGGTGGTCGGTGCCTGCGGCGTGGGTAAGTCCGCCCTGACA<br>ATCCAGCTGATCCAG<br>(нуклеотидная последовательность KRAS(G12D G12V G13D G12C) 100mer “4MUT”) |
| 139 | ATGCCCCACAGTAGCCTCCACCCCAGCATCCCCTGCCCCAGAGGCCACGGCGCACAG<br>AAGGCCGCCCTGGTGCTGCTGAGCGCCTGTCTGGTGACCCTGTGGGGTCTGGGCGAG<br>CCCCCCGAGCACACCCTGCGGTACCTCGTGCTGCATCTGGCCAGCCTGCAGCTGGGC<br>CTGCTGCTGAACGGCGTGTGCAGCCTGGCCGAAGAGCTGAGACACATCCACAGCAGA<br>TACAGAGGCTCCTACTGGAGAACCGTCAGAGCCTGCCTCGGCTGTCCCCTGAGAAGA<br>GGCGCCCTGCTGCTCCTGAGCATCTACTTCTACTACAGCCTGCCCAACGCCGTGGGC<br>CCCCCCTTCACCTGGATGCTGGCCCTGCTGGGCCTGAGCCAGGCCCTGAACATCCTG<br>CTGGGCCTGAAGGGCTTGGCCCCCGCCGAGATCTCCGCCGTGTGCGAGAAGGGCAAC<br>TTCAACATGGCCCATGGCCTTGCCTGGTCCTACTACATCGGCTACCTGAGACTGATC<br>CTGCCCGAGCTGCAGGCCAGAATCAGAACCTACAACCAGCACTACAACAACCTGCTG<br>AGAGGCGCCGTGAGCCAAAGACTGTACATCCTGCTGCCCCTGGACTGCGGCGTGCCC<br>GACAACCTTAGCATGGCCGACCCCAACATCAGATTCCTGGACAAGCTGCCCCAGCAG<br>ACCGGCGACCACGCCGGCATCAAGGACAGAGTGTACAGCAACAGCATCTACGAGCTG<br>CTGGAGAACGGCCAGAGAGCCGGCACCTGCGTGCTGGAGTACGCCACCCCCCTGCAG<br>ACCCTGTTCGCCATGAGCCAGTACAGCCAGGCCGGCTTCAGCAGAGAGGACAGACTG |

| | |
|---|---|
| | GAGCAAGCCAAGCTGTTCTGCAGAACCCTGGAGGACATCCTGGCGGACGCCCCCGAG<br>AGCCAAAACAACTGCAGACTGATCGCCTACCAGGAGCCCGCCGACGACAGCAGCTTC<br>AGCCTGAGCCAGGAAGTGCTGAGACACCTGAGACAGGAAGAGAAGGAGGAGGTGACC<br>GTGGGAAGCCTGAAGACCAGCGCCGTGCCCAGCACCAGCACCATGAGCCAGGAGCCC<br>GAGCTGCTGATCAGCGGCATGGAGAAGCCCCTGCCCCTGAGAACCGACTTCAGC<br>(huSTING(V155M); без эпитопной метки; нуклеотидная последовательность) |
| 140 | ATGCCTCACAGCAGCCTGCACCCTAGCATCCCTTGCCCTAGAGGCCACGGCGCCCAG<br>AAGGCCGCCCTGGTGCTGCTGAGCGCCTGCCTGGTGACCCTGTGGGGCCTGGGCGAG<br>CCTCCTGAGCACACCCTGAGATACCTGGTGCTGCACCTGGCCAGCCTGCAGCTGGGC<br>CTGCTGCTGAACGGCGTGTGCAGCCTGGCCGAGGAGCTGAGACACATCCACAGCAGA<br>TACAGAGGCAGCTACTGGAGAACCGTGAGAGCCTGCCTGGGCTGCCCTCTGAGAAGA<br>GGCGCCCTGCTGCTGCTGAGCATCTACTTCTACTACAGCCTGCCTAACGCCGTGGGC<br>CCTCCTTTCACCTGGATGCTGGCCCTGCTGGGCCTGAGCCAGGCCCTGAACATCCTG<br>CTGGGCCTGAAGGGCCTGGCCCCTGCCGAGATCAGCGCCGTGTGCGAGAAGGGCAAC<br>TTCAACGTGGCCCACGGCCTGGCCTGGAGCTACTACATCGGCTACCTGAGACTGATC<br>CTGCCTGAGCTGCAGGCCAGAATCAGAACCTACAACCAGCACTACAACAACCTGCTG<br>AGAGGCGCCGTGAGCCAGAGACTGTACATCCTGCTGCCTCTGGACTGCGGCGTGCCT<br>GACAACCTGAGCATGGCCGACCCTAACATCAGATTCCTGGACAAGCTGCCTCAGCAG<br>ACCGGCGACCACGCCGGCATCAAGGACAGAGTGTACAGCAACAGCATCTACGAGCTG<br>CTGGAGAACGGCCAGAGAGCCGGCACCTGCGTGCTGGAGTACGCCACCCCTCTGCAG<br>ACCCTGTTCGCCATGAGCCAGTACAGCCAGGCCGGCTTCAGCAGAGAGGACACCCTG<br>GAGCAGGCCAAGCTGTTCTGCAGAACCCTGGAGGACATCCTGGCCGACGCCCCTGAG<br>AGCCAGAACAACTGCAGACTGATCGCCTACCAGGAGCCTGCCGACGACAGCAGCTTC<br>AGCCTGAGCCAGGAGGTGCTGAGACACCTGAGACAGGAGGAGAAGGAGGAGGTGACC<br>GTGGGCAGCCTGAAGACCAGCGCCGTGCCTAGCACCAGCACCATGAGCCAGGAGCCT<br>GAGCTGCTGATCAGCGGCATGGAGAAGCCTCTGCCTCTGAGAACCGACTTCAGC<br>(Hu STING(R284T); без эпитопной метки; нуклеотидная последовательность) |
| 141 | ATGCCCCACAGCAGCCTGCACCCCTCCATCCCCTGTCCCAGAGGCCACGGCGCCCAG<br>AAGGCCGCCCTGGTGCTGCTGAGCGCCTGCCTGGTGACCTTATGGGGCCTGGGCGAG<br>CCCCCCGAGCACACCCTGAGATACCTGGTCCTGCACCTGGCCAGCCTCCAGCTGGGC<br>CTGCTGCTCAACGGCGTGTGTAGCCTGGCCGAGGAGCTGAGACACATCCACAGCAGA<br>TACAGAGGCAGCTACTGGAGAACCGTGAGAGCCTGCCTGGGTTGCCCACTGAGAAGA<br>GGAGCTCTGCTGCTGCTGAGCATCTACTTCTACTACTCGCTGCCCAACGCTGTGGGC |

| | |
|---|---|
| | CCCCCCTTCACCTGGATGCTGGCCCTGCTGGGTCTGAGCCAGGCCCTGAACATCCTC<br>CTGGGCCTGAAGGGCCTGGCCCCCGCCGAGATAAGCGCCGTTTGCGAGAAGGGCAAC<br>TTCAACGTGGCCCATGGCCTGGCCTGGAGCTACTACATCGGCTACTTACGCCTGATC<br>CTGCCCGAGCTGCAGGCCAGAATCAGAACCTACAACCAGCATTACAACAACCTGCTG<br>AGAGGCGCCGTGAGCCAGAGACTGTATATCCTGCTGCCCCTGGACTGCGGCGTGCCC<br>GACAACCTGAGCATGGCCGACCCCAACATCAGATTCCTGGACAAGCTCCCCCAGCAG<br>ACCGGCGACCACGCCGGAATCAAAGACAGAGTGTATAGCAACAGCATCTACGAGCTG<br>CTGGAGAACGGCCAGAGAGCCGGCACCTGCGTACTGGAGTACGCCACCCCCTTGCAG<br>ACCCTGTTTGCCATGAGCCAGTACAGCCAGGCCGGCTTCAGCAGAGAGGACATGCTG<br>GAGCAGGCCAAGCTGTTCTGCAGAACCCTGGAGGACATCCTGGCCGACGCCCCCGAG<br>AGCCAGAACAACTGCAGACTGATCGCCTACCAAGAGCCCGCCGACGACAGCAGCTTC<br>AGCTTAAGCCAGGAGGTGCTGAGACATCTGAGACAGGAGGAGAAGGAGGAGGTGACC<br>GTGGGCAGCCTCAAGACCAGCGCTGTGCCCTCTACCAGCACCATGAGCCAGGAGCCC<br>GAGCTGCTGATCAGCGGCATGGAGAAGCCCCTGCCCCTGAGAACAGACTTCAGC<br>(hu STING (R284M); без эпитопной метки; нуклеотидная последовательность) |
| 142 | ATGCCCCATAGCAGCCTGCACCCCAGCATCCCCTGCCCCAGAGGCCACGGCGCCCAG<br>AAGGCCGCCCTGGTCCTGCTGAGCGCATGCCTGGTCACCCTGTGGGGCCTGGGCGAG<br>CCCCCCGAGCACACCCTGAGATACCTGGTGCTGCACCTCGCCAGCCTGCAGCTGGGC<br>CTGCTGCTGAACGGCGTGTGCAGCCTGGCCGAGGAGCTGAGACACATCCACAGCAGA<br>TATAGAGGCAGCTACTGGAGAACCGTGAGAGCTTGCCTCGGCTGCCCCCTGAGAAGA<br>GGCGCCCTGCTGCTGCTGAGCATCTACTTTTACTACAGCCTGCCCAACGCTGTGGGC<br>CCCCCTTTCACGTGGATGCTCGCCCTGCTGGGACTGAGCCAGGCCCTGAACATCCTG<br>CTGGGCCTTAAGGGCCTAGCCCCCGCCGAGATCAGCGCCGTGTGCGAGAAGGGCAAC<br>TTCAATGTGGCCCACGGCCTGGCCTGGAGCTACTACATCGGCTACCTGAGACTGATC<br>CTGCCCGAGCTGCAGGCCAGAATCAGAACCTACAATCAGCACTACAACAACCTGCTG<br>AGAGGCGCCGTGAGCCAGAGACTGTACATCCTGCTGCCCCTGGACTGCGGCGTGCCC<br>GACAACCTCAGCATGGCCGACCCCAACATCAGATTCCTGGACAAGCTGCCCCAGCAG<br>ACCGGCGACCACGCCGGCATCAAGGATCGCGTGTACAGCAACAGCATCTACGAGCTG<br>CTGGAAAACGGCCAGAGAGCCGGAACCTGCGTGCTGGAGTACGCCACACCCCTGCAG<br>ACCCTGTTCGCCATGAGCCAGTACAGCCAGGCCGGCTTCAGCAGAGAGGACAAGCTG<br>GAGCAGGCCAAGCTGTTCTGCAGAACCCTGGAGGATATCCTCGCCGACGCCCCCGAG<br>AGCCAGAACAACTGCAGGCTGATCGCGTACCAGGAGCCCGCTGACGACAGCAGCTTT<br>AGCCTGAGCCAGGAGGTGCTGAGACATCTGCGTCAAGAGGAAAAGGAGGAGGTGACC<br>GTGGGCTCCCTGAAGACCAGCGCCGTGCCCAGCACCAGCACCATGAGCCAGGAGCCC |

| | |
|---|---|
| | GAGCTGCTGATCAGCGGCATGGAGAAGCCACTGCCCCTCAGAACCGACTTCAGC (Hu STING (R284K); без эпитопной метки; нуклеотидная последовательность) |
| 143 | ATGCCTCACAGCAGCCTGCACCCTAGCATCCCTTGCCCTAGAGGCCACGGCGCCCAG AAGGCCGCCCTGGTGCTGCTGAGCGCCTGCCTGGTGACCCTGTGGGGCCTGGGCGAG CCTCCTGAGCACACCCTGAGATACCTGGTGCTGCACCTGGCCAGCCTGCAGCTGGGC CTGCTGCTGAACGGCGTGTGCAGCCTGGCCGAGGAGCTGAGACACATCCACAGCAGA TACAGAGGCAGCTACTGGAGAACCGTGAGAGCCTGCCTGGGCTGCCCTCTGAGAAGA GGCGCCCTGCTGCTGCTGAGCATCTACTTCTACTACAGCCTGCCTAACGCCGTGGGC CCTCCTTTCACCTGGATGCTGGCCCTGCTGGGCCTGAGCCAGGCCCTGAACATCCTG CTGGGCCTGAAGGGCCTGGCCCCTGCCGAGATCAGCGCCGTGTGCGAGAAGGGCAAC TTCAGCGTGGCCCACGGCCTGGCCTGGAGCTACTACATCGGCTACCTGAGACTGATC CTGCCTGAGCTGCAGGCCAGAATCAGAACCTACAACCAGCACTACAACAACCTGCTG AGAGGCGCCGTGAGCCAGAGACTGTACATCCTGCTGCCTCTGGACTGCGGCGTGCCT GACAACCTGAGCATGGCCGACCCTAACATCAGATTCCTGGACAAGCTGCCTCAGCAG ACCGGCGACCACGCCGGCATCAAGGACAGAGTGTACAGCAACAGCATCTACGAGCTG CTGGAGAACGGCCAGAGAGCCGGCACCTGCGTGCTGGAGTACGCCACCCCTCTGCAG ACCCTGTTCGCCATGAGCCAGTACAGCCAGGCCGGCTTCAGCAGAGAGGACAGACTG GAGCAGGCCAAGCTGTTCTGCAGAACCCTGGAGGACATCCTGGCCGACGCCCCTGAG AGCCAGAACAACTGCAGACTGATCGCCTACCAGGAGCCTGCCGACGACAGCAGCTTC AGCCTGAGCCAGGAGGTGCTGAGACACCTGAGACAGGAGGAGAAGGAGGAGGTGACC GTGGGCAGCCTGAAGACCAGCGCCGTGCCTAGCACCAGCACCATGAGCCAGGAGCCT GAGCTGCTGATCAGCGGCATGGAGAAGCCTCTGCCTCTGAGAACCGACTTCAGC (Hu STING(N154S); без эпитопной метки; нуклеотидная последовательность) |
| 144 | ATGCCTCACAGCAGCCTGCACCCTAGCATCCCTTGCCCTAGAGGCCACGGCGCCCAG AAGGCCGCCCTGGTGCTGCTGAGCGCCTGCCTGGTGACCCTGTGGGGCCTGGGCGAG CCTCCTGAGCACACCCTGAGATACCTGGTGCTGCACCTGGCCAGCCTGCAGCTGGGC CTGCTGCTGAACGGCGTGTGCAGCCTGGCCGAGGAGCTGAGACACATCCACAGCAGA TACAGAGGCAGCTACTGGAGAACCGTGAGAGCCTGCCTGGGCTGCCCTCTGAGAAGA GGCGCCCTGCTGCTGCTGAGCATCTACTTCTACTACAGCCTGCCTAACGCCGTGGGC CCTCCTTTCACCTGGATGCTGGCCCTGCTGGGCCTGAGCCAGGCCCTGAACATCCTG CTGGGCCTGAAGGGCCTGGCCCCTGCCGAGATCAGCGCCCTGTGCGAGAAGGGCAAC TTCAACGTGGCCCACGGCCTGGCCTGGAGCTACTACATCGGCTACCTGAGACTGATC CTGCCTGAGCTGCAGGCCAGAATCAGAACCTACAACCAGCACTACAACAACCTGCTG |

| | |
|---|---|
| | AGAGGCGCCGTGAGCCAGAGACTGTACATCCTGCTGCCTCTGGACTGCGGCGTGCCT<br>GACAACCTGAGCATGGCCGACCCTAACATCAGATTCCTGGACAAGCTGCCTCAGCAG<br>ACCGGCGACCACGCCGGCATCAAGGACAGAGTGTACAGCAACAGCATCTACGAGCTG<br>CTGGAGAACGGCCAGAGAGCCGGCACCTGCGTGCTGGAGTACGCCACCCCTCTGCAG<br>ACCCTGTTCGCCATGAGCCAGTACAGCCAGGCCGGCTTCAGCAGAGAGGACAGACTG<br>GAGCAGGCCAAGCTGTTCTGCAGAACCCTGGAGGACATCCTGGCCGACGCCCCTGAG<br>AGCCAGAACAACTGCAGACTGATCGCCTACCAGGAGCCTGCCGACGACAGCAGCTTC<br>AGCCTGAGCCAGGAGGTGCTGAGACACCTGAGACAGGAGGAGAAGGAGGAGGTGACC<br>GTGGGCAGCCTGAAGACCAGCGCCGTGCCTAGCACCAGCACCATGAGCCAGGAGCCT<br>GAGCTGCTGATCAGCGGCATGGAGAAGCCTCTGCCTCTGAGAACCGACTTCAGC<br>(Hu STING(V147L); без эпитопной метки; нуклеотидная последовательность) |
| 145 | ATGCCTCACAGCAGCCTGCACCCTAGCATCCCTTGCCCTAGAGGCCACGGCGCCCAG<br>AAGGCCGCCCTGGTGCTGCTGAGCGCCTGCCTGGTGACCCTGTGGGGCCTGGGCGAG<br>CCTCCTGAGCACACCCTGAGATACCTGGTGCTGCACCTGGCCAGCCTGCAGCTGGGC<br>CTGCTGCTGAACGGCGTGTGCAGCCTGGCCGAGGAGCTGAGACACATCCACAGCAGA<br>TACAGAGGCAGCTACTGGAGAACCGTGAGAGCCTGCCTGGGCTGCCCTCTGAGAAGA<br>GGCGCCCTGCTGCTGCTGAGCATCTACTTCTACTACAGCCTGCCTAACGCCGTGGGC<br>CCTCCTTTCACCTGGATGCTGGCCCTGCTGGGCCTGAGCCAGGCCCTGAACATCCTG<br>CTGGGCCTGAAGGGCCTGGCCCCTGCCGAGATCAGCGCCGTGTGCGAGAAGGGCAAC<br>TTCAACGTGGCCCACGGCCTGGCCTGGAGCTACTACATCGGCTACCTGAGACTGATC<br>CTGCCTGAGCTGCAGGCCAGAATCAGAACCTACAACCAGCACTACAACAACCTGCTG<br>AGAGGCGCCGTGAGCCAGAGACTGTACATCCTGCTGCCTCTGGACTGCGGCGTGCCT<br>GACAACCTGAGCATGGCCGACCCTAACATCAGATTCCTGGACAAGCTGCCTCAGCAG<br>ACCGGCGACCACGCCGGCATCAAGGACAGAGTGTACAGCAACAGCATCTACGAGCTG<br>CTGGAGAACGGCCAGAGAGCCGGCACCTGCGTGCTGGAGTACGCCACCCCTCTGCAG<br>ACCCTGTTCGCCATGAGCCAGTACAGCCAGGCCGGCTTCAGCAGAGAGGACAGACTG<br>GAGCAGGCCAAGCTGTTCTGCAGAACCCTGGAGGACATCCTGGCCGACGCCCCTGAG<br>AGCCAGAACAACTGCAGACTGATCGCCTACCAGCAGCCTGCCGACGACAGCAGCTTC<br>AGCCTGAGCCAGGAGGTGCTGAGACACCTGAGACAGGAGGAGAAGGAGGAGGTGACC<br>GTGGGCAGCCTGAAGACCAGCGCCGTGCCTAGCACCAGCACCATGAGCCAGGAGCCT<br>GAGCTGCTGATCAGCGGCATGGAGAAGCCTCTGCCTCTGAGAACCGACTTCAGC<br>(Hu STING (E315Q); без эпитопной метки; нуклеотидная последовательность) |
| 146 | ATGCCTCACAGCAGCCTGCACCCTAGCATCCCTTGCCCTAGAGGCCACGGCGCCCAG |

| | |
|---|---|
| | AAGGCCGCCCTGGTGCTGCTGAGCGCCTGCCTGGTGACCCTGTGGGGCCTGGGCGAG<br>CCTCCTGAGCACACCCTGAGATACCTGGTGCTGCACCTGGCCAGCCTGCAGCTGGGC<br>CTGCTGCTGAACGGCGTGTGCAGCCTGGCCGAGGAGCTGAGACACATCCACAGCAGA<br>TACAGAGGCAGCTACTGGAGAACCGTGAGAGCCTGCCTGGGCTGCCCTCTGAGAAGA<br>GGCGCCCTGCTGCTGCTGAGCATCTACTTCTACTACAGCCTGCCTAACGCCGTGGGC<br>CCTCCTTTCACCTGGATGCTGGCCCTGCTGGGCCTGAGCCAGGCCCTGAACATCCTG<br>CTGGGCCTGAAGGGCCTGGCCCCTGCCGAGATCAGCGCCGTGTGCGAGAAGGGCAAC<br>TTCAACGTGGCCCACGGCCTGGCCTGGAGCTACTACATCGGCTACCTGAGACTGATC<br>CTGCCTGAGCTGCAGGCCAGAATCAGAACCTACAACCAGCACTACAACAACCTGCTG<br>AGAGGCGCCGTGAGCCAGAGACTGTACATCCTGCTGCCTCTGGACTGCGGCGTGCCT<br>GACAACCTGAGCATGGCCGACCCTAACATCAGATTCCTGGACAAGCTGCCTCAGCAG<br>ACCGGCGACCACGCCGGCATCAAGGACAGAGTGTACAGCAACAGCATCTACGAGCTG<br>CTGGAGAACGGCCAGAGAGCCGGCACCTGCGTGCTGGAGTACGCCACCCCTCTGCAG<br>ACCCTGTTCGCCATGAGCCAGTACAGCCAGGCCGGCTTCAGCAGAGAGGACAGACTG<br>GAGCAGGCCAAGCTGTTCTGCAGAACCCTGGAGGACATCCTGGCCGACGCCCCTGAG<br>AGCCAGAACAACTGCAGACTGATCGCCTACCAGGAGCCTGCCGACGACAGCAGCTTC<br>AGCCTGAGCCAGGAGGTGCTGAGACACCTGAGACAGGAGGAGAAGGAGGAGGTGACC<br>GTGGGCAGCCTGAAGACCAGCGCCGTGCCTAGCACCAGCACCATGAGCCAGGAGCCT<br>GAGCTGCTGATCAGCGGCATGGAGAAGCCTCTGCCTCTGGCCACCGACTTCAGC<br>(Hu STING (R375A); без эпитопной метки; нуклеотидная последовательность) |
| 147 | ATGCCTCACAGCAGCCTGCACCCTAGCATCCCTTGCCCTAGAGGCCACGGCGCCCAG<br>AAGGCCGCCCTGGTGCTGCTGAGCGCCTGCCTGGTGACCCTGTGGGGCCTGGGCGAG<br>CCTCCTGAGCACACCCTGAGATACCTGGTGCTGCACCTGGCCAGCCTGCAGCTGGGC<br>CTGCTGCTGAACGGCGTGTGCAGCCTGGCCGAGGAGCTGAGACACATCCACAGCAGA<br>TACAGAGGCAGCTACTGGAGAACCGTGAGAGCCTGCCTGGGCTGCCCTCTGAGAAGA<br>GGCGCCCTGCTGCTGCTGAGCATCTACTTCTACTACAGCCTGCCTAACGCCGTGGGC<br>CCTCCTTTCACCTGGATGCTGGCCCTGCTGGGCCTGAGCCAGGCCCTGAACATCCTG<br>CTGGGCCTGAAGGGCCTGGCCCCTGCCGAGATCAGCGCCCTGTGCGAGAAGGGCAAC<br>TTCAGCATGGCCCACGGCCTGGCCTGGAGCTACTACATCGGCTACCTGAGACTGATC<br>CTGCCTGAGCTGCAGGCCAGAATCAGAACCTACAACCAGCACTACAACAACCTGCTG<br>AGAGGCGCCGTGAGCCAGAGACTGTACATCCTGCTGCCTCTGGACTGCGGCGTGCCT<br>GACAACCTGAGCATGGCCGACCCTAACATCAGATTCCTGGACAAGCTGCCTCAGCAG<br>ACCGGCGACCACGCCGGCATCAAGGACAGAGTGTACAGCAACAGCATCTACGAGCTG<br>CTGGAGAACGGCCAGAGAGCCGGCACCTGCGTGCTGGAGTACGCCACCCCTCTGCAG |

| | |
|---|---|
| | ACCCTGTTCGCCATGAGCCAGTACAGCCAGGCCGGCTTCAGCAGAGAGGACAGACTG<br>GAGCAGGCCAAGCTGTTCTGCAGAACCCTGGAGGACATCCTGGCCGACGCCCCTGAG<br>AGCCAGAACAACTGCAGACTGATCGCCTACCAGGAGCCTGCCGACGACAGCAGCTTC<br>AGCCTGAGCCAGGAGGTGCTGAGACACCTGAGACAGGAGGAGAAGGAGGAGGTGACC<br>GTGGGCAGCCTGAAGACCAGCGCCGTGCCTAGCACCAGCACCATGAGCCAGGAGCCT<br>GAGCTGCTGATCAGCGGCATGGAGAAGCCTCTGCCTCTGAGAACCGACTTCAGC<br>(Hu STING(V147L/N154S/V155M); без эпитопной метки; нуклеотидная последовательность) |
| 148 | ATGCCTCACAGCAGCCTGCACCCTAGCATCCCTTGCCCTAGAGGCCACGGCGCCCAG<br>AAGGCCGCCCTGGTGCTGCTGAGCGCCTGCCTGGTGACCCTGTGGGGCCTGGGCGAG<br>CCTCCTGAGCACACCCTGAGATACCTGGTGCTGCACCTGGCCAGCCTGCAGCTGGGC<br>CTGCTGCTGAACGGCGTGTGCAGCCTGGCCGAGGAGCTGAGACACATCCACAGCAGA<br>TACAGAGGCAGCTACTGGAGAACCGTGAGAGCCTGCCTGGGCTGCCCTCTGAGAAGA<br>GGCGCCCTGCTGCTGCTGAGCATCTACTTCTACTACAGCCTGCCTAACGCCGTGGGC<br>CCTCCTTTCACCTGGATGCTGGCCCTGCTGGGCCTGAGCCAGGCCCTGAACATCCTG<br>CTGGGCCTGAAGGGCCTGGCCCCTGCCGAGATCAGCGCCCTGTGCGAGAAGGGCAAC<br>TTCAGCATGGCCCACGGCCTGGCCTGGAGCTACTACATCGGCTACCTGAGACTGATC<br>CTGCCTGAGCTGCAGGCCAGAATCAGAACCTACAACCAGCACTACAACAACCTGCTG<br>AGAGGCGCCGTGAGCCAGAGACTGTACATCCTGCTGCCTCTGGACTGCGGCGTGCCT<br>GACAACCTGAGCATGGCCGACCCTAACATCAGATTCCTGGACAAGCTGCCTCAGCAG<br>ACCGGCGACCACGCCGGCATCAAGGACAGAGTGTACAGCAACAGCATCTACGAGCTG<br>CTGGAGAACGGCCAGAGAGCCGGCACCTGCGTGCTGGAGTACGCCACCCCTCTGCAG<br>ACCCTGTTCGCCATGAGCCAGTACAGCCAGGCCGGCTTCAGCAGAGAGGACATGCTG<br>GAGCAGGCCAAGCTGTTCTGCAGAACCCTGGAGGACATCCTGGCCGACGCCCCTGAG<br>AGCCAGAACAACTGCAGACTGATCGCCTACCAGGAGCCTGCCGACGACAGCAGCTTC<br>AGCCTGAGCCAGGAGGTGCTGAGACACCTGAGACAGGAGGAGAAGGAGGAGGTGACC<br>GTGGGCAGCCTGAAGACCAGCGCCGTGCCTAGCACCAGCACCATGAGCCAGGAGCCT<br>GAGCTGCTGATCAGCGGCATGGAGAAGCCTCTGCCTCTGAGAACCGACTTCAGC<br>(Hu STING(R284M/V147L/N154S/V155M); без эпитопной метки; нуклеотидная последовательность) |
| 149 | TGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCTAGCTTCTTGCCCCTTGGGCCTCCCCCCAG<br>CCCCTCCTCCCCTTCCTGCACCCGTACCCCCCAAACACCATTGTCACACTCCAGTGG<br>TCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC<br>(3’-НТО, используемая в конструкте STING V155M, содержащем сайт связывания miR122) |

| | |
|---|---|
| 150 | ATGGAGACCCCCAAGCCTAGAATCCTGCCCTGGCTGGTGAGCCAGCTGGACCTGGGC<br>CAGCTGGAGGGCGTAGCCTGGCTGGACGAGAGCAGAACCAGATTCAGAATCCCCTGG<br>AAGCACGGCCTGAGACAAGACGCCCAGATGGCCGACTTCGGCATCTTCCAGGCCTGG<br>GCCGAGGCCAGCGGCGCCTACACCCCTGGCAAGGATAAGCCCGATGTGAGCACCTGG<br>AAGAGAAACTTCAGAAGCGCCCTGAACAGAAAGGAGGTGCTGAGACTGGCCGCCGAC<br>AATAGCAAGGACCCCTACGACCCCCACAAGGTGTACGAGTTCGTTACCCCCGGCGCC<br>AGGGACTTCGTGCACCTGGGCGCCAGCCCCGACACCAACGGCAAGAGCAGCCTGCCC<br>CACAGCCAGGAGAACCTGCCCAAGCTGTTCGATGGCCTGATCCTGGGCCCCCTGAAG<br>GACGAGGGCAGCAGCGACCTGGCCATCGTGAGCGACCCTAGCCAGCAGCTGCCCTCC<br>CCCAACGTGAACAACTTCCTGAACCCCGCCCCCCAGGAGAACCCCCTGAAGCAACTG<br>CTGGCCGAGGAGCAGTGGGAGTTCGAGGTGACCGCCTTCTACAGAGGCAGACAGGTG<br>TTCCAGCAGACCCTGTTCTGCCCCGGCGGCCTGAGACTGGTAGGCAGCACCGCTGAC<br>ATGACCCTGCCCTGGCAGCCCGTGACCCTGCCCGACCCCGAAGGCTTTCTGACCGAC<br>AAGCTGGTGAAGGAGTACGTCGGCCAAGTGCTGAAGGGCCTGGGCAACGGCCTGGCC<br>CTGTGGCAGGCCGGCCAGTGCCTGTGGGCCCAGAGACTCGGCCACAGCCACGCCTTC<br>TGGGCCCTGGGCGAGGAACTCCTGCCCGATAGCGGCAGAGGCCCCGACGGCGAGGTG<br>CACAAGGACAAGGACGGCGCCGTGTTCGACCTGCGCCCCTTCGTGGCCGACCTGATC<br>GCCTTCATGGAGGGCAGCGGCCACAGCCCCAGATATACCCTGTGGTTCTGCATGGGC<br>GAGATGTGGCCCCAGGACCAGCCCTGGGTGAAGAGACTGGTGATGGTGAAGGTGGTG<br>CCCACCTGCCTGAAAGAGCTGCTGGAGATGGCCAGAGAGGGCGGCGCCAGCTCCCTG<br>AAAACCGTGGACCTGCACATTGACAACAGCCAGCCCATCAGCCTGACCAGCGACCAG<br>TACAAGGCCTACCTGCAGGACCTGGTGGAGGACATGGACTTCCAGGCCACCGGCAAC<br>ATC<br>(супермышиный IRF3 S396D; без эпитопной метки) |
| 151 | ATGGGCACCCCCAAGCCCAGAATCCTGCCCTGGCTGGTGAGCCAGCTGGACCTGGGC<br>CAGCTGGAGGGAGTGGCCTGGGTGAACAAGAGCAGAACCAGATTCAGAATCCCCTGG<br>AAGCACGGCCTCAGACAGGACGCCCAGCAGGAGGACTTCGGCATTTTTCAGGCTTGG<br>GCCGAGGCCACCGGCGCCTACGTGCCCGGCAGAGACAAGCCCGACCTGCCCACCTGG<br>AAAAGAAACTTCAGAAGCGCCTTGAATAGAAAGGAGGGCCTGAGACTGGCCGAGGAC<br>AGAAGCAAGGACCCCCACGACCCTCACAAGATCTACGAGTTCGTGAATAGCGGCGTG<br>GGCGACTTTAGCCAGCCCGACACCAGCCCCGACACCAACGGCGGCGGCAGCACCAGC<br>GACACGCAGGAGGACATCCTGGATGAACTGCTGGGCAACATGGTGCTGGCCCCCCTG<br>CCCGATCCCGGCCCCCCTTCGCTTGCCGTGGCCCCCGAGCCCTGCCCCCAGCCCCTG<br>AGAAGCCCCTCTCTGGATAACCCCACCCCCTTCCCCAACCTGGGCCCCAGCGAGAAT<br>CCACTGAAGAGACTTCTGGTCCCCGGCGAGGAGTGGGAGTTCGAGGTGACCGCCTTC |

| | |
|---|---|
| | TACAGAGGCAGACAGGTGTTCCAGCAGACCATCAGCTGCCCCGAAGGCCTGAGATTA<br>GTGGGCAGCGAAGTGGGCGACAGGACCCTGCCCGGGTGGCCCGTGACCCTGCCCGAT<br>CCCGGCATGAGCCTGACCGACAGAGGTGTGATGAGCTACGTGAGACACGTGCTGAGC<br>TGCCTGGGCGGCGGCCTGGCACTGTGGAGAGCCGGCCAGTGGCTGTGGGCCCAGAGA<br>CTGGGCCACTGCCACACCTACTGGGCCGTGAGCGAGGAGCTGCTGCCCAACAGCGGC<br>CACGGCCCCGACGGCGAGGTGCCCAAGGACAAGGAAGGGGGCGTGTTCGACCTGGGC<br>CCCTTCATCGTAGACCTGATCACCTTTACCGAGGGCAGCGGCAGGAGCCCCAGATAC<br>GCCCTGTGGTTCTGCGTGGGCGAAAGCTGGCCCCAGGACCAGCCCTGGACCAAGAGA<br>CTGGTGATGGTGAAGGTAGTGCCCACCTGCCTGAGAGCCTTAGTGGAGATGGCCAGA<br>GTGGGCGGGGCCAGCAGCCTGGAGAACACCGTGGATCTTCACATCGACAACAGCCAC<br>CCCCTGAGCCTGACCAGCGACCAGTACAAGGCCTACCTGCAGGACCTGGTGGAGGGC<br>ATGGACTTCCAGGGCCCCGGCGAGACC<br>(суперчеловеческий IRF3 S396D; без эпитопной метки) |
| 152 | ATGGCGCTGGCCCCCGAAAGAGCCGCCCCCAGAGTCCTCTTCGGCGAATGGCTCCTT<br>GGCGAAATTTCGTCGGGCTGCTACGAGGGCTTACAATGGCTGGATGAGGCGAGAACC<br>TGTTTCAGGGTGCCCTGGAAACACTTCGCCAGAAAGGATCTAAGCGAAGCAGATGCT<br>AGAATTTTTAAGGCTTGGGCCGTGGCCAGGGGAAGATGGCCCCCCTCGAGCAGAGGC<br>GGCGGCCCTCCCCCCGAGGCAGAAACGGCCGAGAGAGCCGGATGGAAAACCAATTTC<br>AGATGCGCCCTGAGATCTACAAGAAGATTCGTGATGCTTAGAGACAACAGCGGAGAT<br>CCCGCCGATCCCCATAAGGTGTATGCCCTGTCCCGGGAGCTGTGCTGGAGGGAAGGG<br>CCTGGCACTGACCAGACCGAAGCCGAAGCCCCCGCGGCCGTGCCGCCGCCCCAAGGA<br>GGCCCACCAGGCCCTTTCCTCGCTCACACCCACGCCGGTCTGCAAGCCCCGGGACCT<br>CTACCTGCCCCTGCCGGCGATAAAGGCGACCTGTTGCTGCAGGCCGTCCAACAGAGC<br>TGCCTGGCCGATCATCTGCTCACAGCCAGCTGGGGCGCTGACCCCGTCCCAACAAAG<br>GCCCCCGGTGAGGGCCAAGAAGGCCTGCCTCTGACCGGCGCCTGTGCCGGCGGCCCT<br>GGCCTGCCTGCTGGCGAGCTGTACGGATGGGCTGTCGAAACCACTCCCTCCCCCGGC<br>CCCCAACCTGCGGCCCTGACAACCGGCGAGGCAGCCGCACCCGAAAGCCCCCACCAG<br>GCCGAACCCTACCTCAGTCCCAGCCCCTCCGCCTGCACCGCTGTGCAGGAGCCCAGC<br>CCCGGTGCTCTGGACGTAACAATCATGTACAAAGGCAGAACCGTGCTTCAGAAGGTG<br>GTTGGACACCCCTCCTGTACTTTTCTCTACGGCCCCCCCGACCCTGCCGTGAGAGCT<br>ACCGACCCGCAACAGGTGGCCTTTCCCTCGCCCGCCGAACTGCCCGATCAAAAACAG<br>CTGAGATACACCGAGGAGCTGCTGAGACACGTGGCGCCGGGCTTACACCTAGAGTTG<br>AGAGGCCCCCAACTCTGGGCCAGACGCATGGGCAAGTGTAAGGTGTACTGGGAGGTC<br>GGGGGCCCTCCCGGCTCTGCCAGCCCCAGCACCCCTGCTTGTCTCTTGCCCAGAAAC<br>TGTGATACCCCCATCTTCGACTTCCGTGTATTTTTCCAGGAACTGGTCGAGTTTAGA |

| | |
|---|---|
| | GCCAGACAGAGACGAGGCAGCCCCAGATATACAATCTACCTCGGCTTCGGCCAGGAC<br>CTGAGTGCCGGCAGACCTAAGGAGAAGTCGCTGGTCCTAGTGAAGTTAGAGCCCTGG<br>CTATGTAGAGTGCACCTGGAGGGCACCCAGAGAGAAGGAGTGAGCAGCCTGGACAGC<br>AGCAGCCTGAGTCTGTGCCTGAGCTCCGCCAACTCGCTGTATGATGACATCGAGTGT<br>TTCCTCATGGAGCTGGAGCAGCCCGCC<br>(Изоформа A Hu IRF7 дикого типа; P037 без эпитопной метки) |
| 153 | ATGGCCCTTGCCCCTGAGCGGGCCGCCCCCAGAGTGTTATTCGGCGAGTGGCTGCTG<br>GGCGAGATCAGCAGCGGCTGCTACGAGGGACTGCAGTGGCTGGACGAGGCTAGAACC<br>TGCTTCAGAGTGCCCTGGAAGCATTTCGCCAGAAAAGACCTGAGCGAGGCTGATGCT<br>AGAATCTTCAAAGCCTGGGCTGTGGCCCGAGGAAGATGGCCCCCCAGCAGCAGAGGA<br>GGCGGCCCTCCTCCCGAGGCCGAAACCGCAGAGCGTGCTGGCTGGAAAACCAACTTT<br>AGGTGTGCCCTGAGGAGCACCAGAAGATTCGTTATGCTCAGAGACAACAGCGGGGAC<br>CCCGCCGACCCGCACAAGGTGTACGCCTTAAGTAGGGAGCTGTGCTGGAGAGAGGGA<br>CCGGGGACCGACCAAACCGAGGCTGAGGCGCCCGCCGCCGTTCCACCTCCCCAGGGT<br>GGTCCCCCAGGGCCCTTTCTGGCACACACCCACGCCGGATTACAGGCGCCAGGGCCC<br>TTACCCGCCCCCGCCGGAGACAAAGGCGACCTCCTGCTGCAAGCCGTGCAACAAAGC<br>TGCCTGGCCGATCACTTACTAACCGCTAGCTGGGGCGCCGATCCTGTTCCCACCAAG<br>GCCCCCGGTGAAGGGCAAGAAGGACTGCCCTTAACCGGCGCCTGTGCCGGAGGCCCT<br>GGTCTGCCAGCCGGCGAGCTGTACGGTTGGGCTGTCGAAACAACACCCAGTCCGGGC<br>CCACAGCCTGCCGCTCTGACCACCGGCGAAGCCGCCGCCCCCGAGAGCCCACACCAG<br>GCTGAACCCTACCTGAGCCCCAGCCCCAGCGCCTGCACCGCTGTGCAGGAGCCTAGC<br>CCCGGCGCTCTTGATGTGACAATAATGTACAAGGGCAGGACCGTGCTGCAAAAGGTC<br>GTGGGCCATCCGTCGTGTACCTTTCTGTACGGCCCTCCAGACCCCGCGGTTAGAGCC<br>ACCGACCCCCAGCAAGTCGCCTTCCCCTCCCCCGCCGAACTGCCCGACCAAAAGCAG<br>CTGCGGTACACAGAAGAACTACTTAGACACGTGGCCCCCGGTCTGCACTTGGAGCTG<br>AGAGGCCCCCAGCTCTGGGCCAGAAGAATGGGCAAGTGCAAAGTGTACTGGGAGGTG<br>GGCGGCCCACCCGGCTCAGCTTCGCCCTCCACACCCGCATGCCTGCTGCCCAGAAAT<br>TGCGACACGCCCATCTTCGATTTTAGAGTGTTCTTTCAGGAGTTGGTGGAGTTCAGA<br>GCCAGACAAAGACGCGGCAGCCCCAGATACACCATTTACCTCGGCTTCGGCCAGGAC<br>CTCAGCGCTGGCAGACCCAAGGAGAAGAGTCTGGTCCTCGTGAAGCTGGAGCCCTGG<br>CTGTGCAGAGTGCACCTGGAGGGCACCCAGCGTGAAGGCGTGAGCAGCCTGGATTCA<br>AGCGACCTGGACCTATGCCTAAGCAGCGCTAACTCACTGTACGACGATATCGAATGC<br>TTCCTGATGGAACTGGAGCAGCCTGCC<br>(конститутивно активный Hu IRF7 S477D/S479D; P033 без |

| | |
|---|---|
| | эпитопной метки) |
| 154 | ATGGCCCTGGCACCCGAGAGGGCCGCCCCCAGGGTGCTCTTCGGCGAGTGGTTACTA<br>GGCGAAATTAGCAGCGGCTGCTATGAAGGCCTTCAGTGGCTGGACGAGGCCAGAACC<br>TGCTTTAGAGTTCCCTGGAAGCACTTCGCCCGGAAAGATCTCTCTGAAGCCGACGCC<br>AGAATATTCAAGGCCTGGGCTGTCGCCAGGGGCAGGTGGCCACCCTCCAGCCGAGGT<br>GGCGGCCCTCCCCCTGAGGCTGAGACTGCGGAAAGGGCGGGCTGGAAGACCAATTTC<br>AGATGCGCTCTGAGAAGCACCAGACGTTTTGTGATGCTAAGAGACAATAGCGGCGAT<br>CCCGCCGACCCCCATAAGGTATACGCACTGAGCCGAGAGCTCTGTTGGAGAGAAGGC<br>CCCGGCACCGACCAGACCGAGGCTGAAGCCCCTGCAGCCGTGCCCCCCCCTCAAGGC<br>GGGCCCCCCGGCCCCTTCCTGGCCCATACCCATGCAGGGTTACAAGCACCCGGGCCC<br>TTGCCCGCCCCAGCGGGAGACAAGGGCGACCTCTTACTGCAGGCCGTGCAACAAAGT<br>TGTCTGGCGGACCACCTGCTGACCGCATCATGGGGCGCGGATCCTGTGCCCACCAAG<br>GCACCCGGCGAAGGCCAGGAGGGCCTGCCCTTGACCGGCGCCTGCGCTGGCGGACCC<br>GGCCTACCTGCTGGCGAACTGTATGGCTGGGCCGTAGAGACGACTCCCAGCCCTGGC<br>CCACAACCCGCGGCTTTGACCACCGGCGAAGCCGCCGCCCCCGAGTCTCCGCACCAG<br>GCCGAGCCTTACCTCAGCCCAAGCCCTAGCGCCTGCACCGCCGTGCAAGAACCTAGC<br>CCCGGAGCCCTGGATGTGACAATCATGTACAAGGGTAGAACCGTACTGCAAAAGGTG<br>GTGGGTCATCCCAGCTGCACCTTTCTTTACGGCCCACCCGACCCTGCCGTGCGAGCC<br>ACAGACCCACAACAGGTCGCCTTCCCAAGCCCCGCCGAACTGCCCGATCAGAAACAG<br>CTGAGATATACAGAGGAGCTTCTGCGGCACGTAGCTCCCGGCCTACATCTCGAGCTG<br>AGGGGCCCACAACTGTGGGCCAGACGCATGGGCAAATGCAAGGTCTACTGGGAAGTG<br>GGAGGCCCCCCCGGCAGCGCATCTCCCAGCACGCCCGCGTGCCTGCTGCCTAGAAAT<br>TGCGACACCCCCATCTTTGACTTCCGGGTATTCTTTCAGGAGCTGGTAGAGTTCAGA<br>GCCAGGCAGCGGAGGGGCTCCCCCAGATACACAATCTACCTGGGCTTCGGACAGGAC<br>CTGTCCGCCGGCCGCCCCAAGGAAAAGAGCCTGGTGCTGGTGAAGCTGGAGCCCTGG<br>CTGTGTAGGGTACACCTCGAAGGCACCCAGAGAGAAGGAGTGAGCTCGCTTGATGAC<br>AGCGATCTGTCGGATTGCCTTAGCAGCGCCAACAGCCTGTATGATGATATCGAGTGC<br>TTCCTTATGGAACTGGAGCAGCCCGCC<br>(конститутивно активный Hu IRF7 S475D/S477D/L480D; P034 без эпитопной метки) |
| 155 | ATGGCCCTAGCCCCCGAAAGAGCAGCTCCCAGAGTGCTGTTCGGCGAATGGCTGCTT<br>GGCGAGATCAGCAGCGGCTGCTACGAAGGCCTGCAGTGGCTGGACGAAGCCCGCACC<br>TGTTTCAGAGTGCCCTGGAAGCACTTCGCTAGAAAGGATTTGAGCGAGGCTGATGCT<br>AGAATCTTTAAGGCTTGGGCTGTGGCAAGAGGCAGATGGCCGCCTAGTAGCAGAGGG<br>GGCGGACCTCCCCCCGAGGCTGAGACCGCTGAGAGAGCAGGGTGGAAAACCAACTTC |

| | |
|---|---|
| | AGATGCGCGCTGAGAAGCACCCGAAGATTCGTGATGCTACGTGACAATAGCGGCGAC<br>CCCGCCGACCCCCACAAAGTGTACGCCCTGTCCCGAGAACTTTGCTGGAGAGAGGGA<br>CCCGGCACCGATCAAACAGAGGCTGAGGCCCCGGCCGCTGTACCCCCGCCCCAAGGA<br>GGCCCCCCAGGCCCCTTTCTGGCTCATACACATGCCGGCCTGCAGGCACCCGGGCCC<br>CTCCCGGCTCCTGCCGGCGACAAGGGCGATCTCCTTCTCCAGGCCGTGCAGCAGAGC<br>TGCCTGGCCGATCACCTGCTGACCGCCTCGTGGGGCGCCGACCCCGTGCCCACCAAA<br>GCCCCGGGTGAAGGCCAAGAGGGGCTCCCTTTAACCGGAGCATGCGCCGGAGGCCCC<br>GGCCTGCCAGCCGGCGAGTTATATGGCTGGGCTGTGGAGACCACACCCTCCCCCGGC<br>CCTCAACCCGCTGCCCTGACCACCGGTGAGGCCGCCGCCCCCGAGAGCCCACACCAG<br>GCCGAACCCTACCTGAGCCCTAGCCCTAGCGCCTGCACCGCCGTGCAAGAACCCAGC<br>CCCGGAGCCCTGGATGTGACCATTATGTACAAGGGCCGGACAGTGCTGCAAAAGGTT<br>GTGGGACACCCGAGCTGCACCTTTCTGTACGGTCCGCCTGACCCCGCCGTGAGAGCC<br>ACGGACCCGCAGCAGGTGGCCTTCCCCTCACCCGCGGAGCTGCCCGACCAAAAGCAA<br>CTCAGATACACAGAAGAACTATTGCGTCACGTCGCGCCCGGCCTGCATCTGGAGCTG<br>AGAGGCCCCCAGCTCTGGGCCAGAAGGATGGGCAAATGCAAGGTGTACTGGGAGGTG<br>GGAGGCCCCCCCGGCAGCGCCAGCCCCAGCACTCCCGCGTGCCTGCTGCCCAGAAAT<br>TGCGACACTCCCATCTTCGATTTCAGGGTGTTCTTCCAGGAGCTGGTGGAGTTCAGA<br>GCCAGGCAGAGAAGGGGTAGCCCCAGATACACAATCTATCTAGGCTTTGGACAAGAT<br>CTGAGCGCCGGCCGGCCTAAGGAAAAAAGCCTGGTGCTGGTAAAGCTGGAGCCGTGG<br>CTTTGTAGAGTGCACCTGGAGGGGACGCAGCGAGAGGGCGTGAGCAGCTTAGACGAC<br>GATGACTTGGATCTGTGTCTCGACAGCGCCAACGACTTGTACGACGACATCGAGTGC<br>TTCCTGATGGAACTGGAGCAGCCCGCC<br>(конститутивно активный Hu IRF7 S475D/S476D/S477D/S479D/S483D/S487D; P035 без эпитопной метки) |
| 156 | ATGGCCCTGGCCCCCGAGAGAGCCGCCCCCAGAGTGCTCTTCGGCGAGTGGCTGCTG<br>GGCGAGATAAGCAGCGGCTGCTACGAAGGTCTGCAGTGGCTAGACGAGGCCAGAACC<br>TGCTTTAGAGTGCCCTGGAAGCACTTCGCTCGAAAGGACCTGTCCGAGGCCGATGCT<br>AGAATTTTTAAGGCTTGGGCCGTCGCTAGGGGAAGATGGCCCCCTAGCAGTAGAGGC<br>GGCGGCCCCCCTCCCGAAGCCGAGACGGCCGAGAGGGCCGGCTGGAAAACCAATTTC<br>AGATGCGCCCTGAGGAGCACCCGCAGGTTCGTAATGCTGCGAGACAATAGCGGCGAT<br>CCTGCGGATCCTCACAAGGTTTACGCCTTGAGTAGAGAACTGTGCTGGCGGGAGGGC<br>CCCGGAACCGACCAGACGGAGGCAGAGGCACCCGCTGCCGTGCCCCCCCCTCAAGGA<br>GGACCCCCTGGACCCTTTCTGGCCCACACCCACGCTGGTCTGCAGGCCCCAGGCCCA<br>CTGCCCGCCCCAGCGGGCGATAAGGGTGACCTGCTCCTACAGGCGGTGCAACAGAGC |

| | |
|---|---|
| | TGTCTGGCCGACCACCTGTTGACCGCCAGCTGGGGGGCCGACCCGGTGCCCACCAAA<br>GCTCCCGGAGAGGGCCAAGAAGGCCTCCCACTAACTGGCGCCTGCGCCGGGGGCCCG<br>GGATTACCCGCCGGCGAGCTGTATGGCTGGGCCGTGGAGACCACGCCCAGCCCCGAG<br>GGCGTGTCGTCCCTGGACAGCAGCAGCCTGAGCCTGTGCCTGAGCTCCGCCAACAGC<br>CTGTATGACGACATCGAGTGCTTCCTGATGGAGCTGGAACAACCCGCC<br>(конститутивно активный усеченный Hu IRF7 1-246+468-503; P032 без эпитопной метки) |
| 157 | ATGGCACTGGCGCCTGAAAGAGCCGCTCCGCGTGTGCTCTTCGGCGAGTGGCTGCTG<br>GGCGAGATCAGCTCCGGCTGCTACGAGGGTCTACAGTGGCTGGACGAGGCCAGAACC<br>TGTTTTAGAGTGCCCTGGAAGCACTTCGCGAGAAAGGACCTGAGCGAGGCCGACGCC<br>AGAATCTTCAAAGCCTGGGCAGTGGCTAGGGGCAGATGGCCTCCCAGCAGCCGGGGC<br>GGCGGCCCACCCCCCGAGGCCGAAACCGCCGAAAGAGCTGGCTGGAAGACCAACTTC<br>AGATGCGCCCTGAGAAGCACCAGAAGATTTGTCATGCTGAGAGATAATTCAGGAGAC<br>CCCGCCGACCCTCACAAGGTGTACGCCCTGTCCAGAGAGCTGTGTTGGAGAGAGGGC<br>CCCGGAACCGACCAGACCGAGGCCGAGGCTCCAGCTGCCGTGCCACCCCCCCAAGGC<br>GGACCACCCGGCCCCTTCTTGGCACATACGCACGCCGGCCTCCAGGCTCCCGGCCCT<br>CTGCCCGCCCCTGCTGGTGACAAAGGCGATCTGCTGCTGCAAGCCGTCCAGCAATCC<br>TGCTTGGCTGACCACCTGCTGACCGCTAGCTGGGGAGCCGACCCCGTTCCCACCAAG<br>GCTCCCGGAGAAGGACAGGAGGGCCTGCCCCTTACCGGCGCTTGCGCGGGGGGCCCT<br>GGCTTGCCTGCCGGCGAACTGTACGGCTGGGCCGTGGAGACCACGCCTTCCCCCGAG<br>GGCGTGTCCAGCCTGGACGATGATGACCTGGATCTGTGCCTGGACAGCGCCAACGAC<br>CTGTACGATGACATCGAGTGCTTTTTGATGGAGCTGGAGCAGCCCGCC<br>(конститутивно активный усеченный Hu IRF7 1-246+468-503 плюс S475D/S476D/S477D/S479D/S483D/S487D; P036 без эпитопной метки) |
| 158 | ATGGCCCTGGCCCCCGAGAGAGCCGCGCCCAGAGTGCTGTTCGGCGAATGGCTGCTG<br>GGCGAGATCAGCAGCGGCTGCTATGAGGGCCTGCAGTGGCTCGACGAAGCCAGGACG<br>TGCTTCAGAGTCCCCTGGAAGCACTTCGCCAGAAAGGATCTGAGCGAGGCTGACGCC<br>AGAATCTTCAAGGCCTGGGCAGTTGCGCGTGGGAGATGGCCCCCCAGCTCGCGGGGC<br>GGCGGTCCCCCCCCCTGAGGCCGAGACCGCCGAAAGAGCCGGATGGAAAACCAACTTT<br>CGATGCGCCCTCAGAAGCACCAGACGGTTTGTGATGCTGAGAGATAACAGCGGCGAC<br>CCTGCAGACCCCCATAAAGTGTATGCCCTGAGCAGAGAGCTGTGTTGGCGAGAGGGC<br>CCCGGAACCGACCAAACCGAGGCCGAGGCCCCCGCCGCCGTACCCCCCCCTCAAGGC<br>CCCCAGCCTGCTGCTCTGACCACGGGAGAAGCCGCCGCTCCTGAGAGCCCCCACCAA<br>GCCGAGCCCTATCTGAGCCCTAGCCCCAGCGCCTGCACCGCCGTGCAGGAGCCCTCA |

| | |
|---|---|
| | CCGGGCGCCCTAGACGTGACCATCATGTACAAGGGGCGCACGGTGCTGCAAAAGGTG<br>GTGGGCCACCCCAGCTGCACCTTCCTGTACGGCCCCCCCGACCCTGCCGTGAGAGCC<br>ACCGACCCCCAGCAAGTCGCCTTCCCCAGCCCCGCCGAGCTGCCCGACCAGAAGCAG<br>CTGAGGTACACCGAGGAGTTGCTGAGACATGTGGCCCCCGGCTTGCACCTCGAGCTG<br>AGAGGCCCGCAGCTCTGGGCCAGAAGAATGGGCAAGTGCAAGGTGTACTGGGAGGTG<br>GGCGGCCCCCCCGGCAGCGCGAGCCCAAGCACCCCGGCCTGCCTGCTGCCTAGAAAC<br>TGCGACACCCCTATCTTCGACTTCAGAGTATTTTTCCAGGAGCTGGTCGAGTTCAGG<br>GCCAGACAGCGTAGAGGCAGCCCCAGATACACCATCTACCTTGGATTCGGCCAGGAC<br>CTGAGCGCCGGCAGACCCAAAGAGAAGTCCCTGGTACTGGTGAAGCTAGAGCCCTGG<br>CTGTGTAGGGTGCATCTGGAAGGCACCCAAAGAGAGGGCGTAAGCTCGCTTGACAGC<br>AGCAGCCTCAGCCTGTGCCTGAGCAGCGCTAACAGCTTATACGACGACATCGAGTGC<br>TTCCTGATGGAGCTGGAACAACCCGCC<br>(усеченный Hu IRF7 1-151+247-503; P038 без эпитопной метки; нулевая мутация) |
| 159 | ATGGGCGGCCCTCCCGGGCCTTTCCTGGCCCATACACACGCCGGCCTACAGGCTCCT<br>GGCCCTCTGCCCGCCCCGGCCGGCGACAAGGGCGACCTCCTGCTGCAGGCCGTGCAG<br>CAGTCCTGTCTGGCCGACCACCTGCTGACTGCTAGCTGGGGCGCCGATCCCGTGCCC<br>ACCAAGGCCCCAGGAGAGGGGCAAGAGGGCCTGCCTCTAACCGGCGCATGCGCAGGT<br>GGACCAGGCCTCCCCGCCGGCGAGCTGTATGGTTGGGCCGTGGAGACAACCCCCAGC<br>CCCGGCCCGCAGCCTGCTGCGCTGACCACAGGCGAGGCCGCTGCCCCTGAGAGCCCC<br>CACCAAGCTGAACCCTACCTGAGCCCCAGCCCCTCTGCCTGCACAGCGGTGCAGGAG<br>CCCAGTCCCGGCGCCTTGGACGTGACCATCATGTATAAGGGCAGGACTGTGTTACAA<br>AAGGTAGTGGGCCACCCAAGTTGTACCTTTCTGTACGGGCCCCCCGACCCAGCCGTG<br>CGCGCCACCGACCCCCAGCAGGTGGCCTTCCCCAGCCCCGCTGAGTTGCCCGATCAG<br>AAACAACTCCGGTACACCGAGGAATTACTTAGACATGTGGCTCCCGGCCTGCATCTG<br>GAGCTTAGAGGTCCACAGTTGTGGGCCAGAAGAATGGGCAAGTGCAAGGTTTATTGG<br>GAGGTCGGAGGCCCCCCGGGCAGCGCCAGCCCCAGCACCCCCGCCTGTCTTCTGCCC<br>AGAAACTGCGACACCCCAATCTTCGATTTCAGAGTGTTTTTCCAGGAACTGGTGGAG<br>TTCAGAGCAAGGCAAAGAAGAGGCAGCCCTAGATACACCATCTACCTGGGCTTTGGC<br>CAAGACCTGAGCGCCGGCAGACCCAAGGAAAAATCCCTGGTCCTGGTGAAACTGGAG<br>CCCTGGCTGTGCAGAGTCCACCTGGAGGGCACCCAGAGAGAGGGCGTGAGCAGCCTG<br>GACTCGAGCAGCCTGTCCCTGTGTCTGAGCAGCGCGAATTCGCTATATGACGACATC<br>GAATGCTTTCTGATGGAGCTGGAACAGCCCGCC<br>(усеченный Hu IRF7 152-503; P039 без эпитопной метки; нулевая мутация) |

| | |
|---|---|
| 160 | ATGCCTCACAGCAGCCTCCACCCTAGCATCCCTTGCCCTAGAGGCCACGGCGCCCAG<br>AAGGCCGCCCTCGTGCTTTTAAGCGCCTGCTTGGTGACCCTTTGGGGCTTGGGCGAG<br>CCTCCAGAGCACACCTTGAGATATTTGGTGCTCCACCTGGCCAGCCTTCAGCTGGGC<br>TTGTTACTCAACGGCGTGTGCAGCCTGGCCGAGGAGCTGAGACACATCCACAGCAGA<br>TACAGAGGCAGCTACTGGAGAACCGTGAGAGCGTGTCTGGGCTGCCCTCTGAGAAGA<br>GGCGCCTTGCTTCTTCTCAGTATCTACTTCTACTACTCCCTGCCTAACGCCGTGGGC<br>CCTCCTTTCACCTGGATGCTGGCACTGCTCGGCCTCAGCCAGGCCCTGAACATCTTG<br>TTGGGCTTGAAGGGCCTGGCCCCTGCCGAGATCAGCGCCGTGTGCGAGAAGGGCAAC<br>TTCAACATGGCCCACGGATTGGCTTGGAGCTACTACATCGGCTACCTGAGACTGATC<br>CTGCCTGAGCTGCAGGCCAGAATCAGAACCTACAACCAGCACTACAACAACCTGCTG<br>CGCGGCGCAGTGAGCCAGAGACTGTATATTCTGCTGCCTCTGGACTGCGGCGTGCCT<br>GACAACCTGAGCATGGCCGACCCTAACATCAGATTCCTGGACAAGCTGCCTCAGCAG<br>ACCGGCGACCACGCCGGCATCAAGGACAGAGTGTACAGCAACAGCATCTATGAGCTG<br>CTCGAGAATGGCCAGAGAGCCGGCACCTGCGTGCTGGAGTACGCCACCCCTCTGCAG<br>ACCCTGTTCGCCATGAGCCAGTATAGTCAAGCTGGCTTCAGCAGAGAGGACAGACTG<br>GAGCAGGCCAAGCTGTTCTGCAGAACCCTGGAGGACATTCTGGCTGACGCCCCTGAG<br>AGCCAGAACAACTGCCGACTGATCGCCTACCAGGAACCAGCCGACGACAGCAGCTTC<br>AGTCTTTCTCAGGAGGTTCTTCGCCACTTGCGCCAGGAGGAGAAGGAGGAGGTGACC<br>GTGGGCAGCCTGAAGACCTCCGCAGTCCCTAGCACCAGCACCATGAGTCAGGAGCCG<br>GAGCTATTAATCAGCGGCATGGAGAAGCCTCTTCCACTCCGAACCGACTTCAGCGCC<br>ACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCAGGTGACGTTGAGGAGAATCCGGGACCTATG<br>ACCGAGTACAAGCTGGTGGTTGTGGGCGCCGACGGCGTGGGCAAGAGCGCCCTGACC<br>ATCCAGCTGATCCAG<br>(KRAS(G12D)25mer_nt.STING(V155M)) |
| 161 | ATGACCGAGTACAAGCTAGTAGTCGTGGGCGCCGACGGCGTGGGCAAGAGCGCCCTC<br>ACCATCCAGCTAATCCAGGCCACCAACTTCAGCTTGCTCAAGCAGGCCGGCGACGTG<br>GAGGAGAACCCAGGCCCTATGCCTCACAGCAGCCTTCACCCTAGCATCCCTTGCCCT<br>AGAGGCCACGGCGCCCAGAAGGCCGCCCTGGTGCTGCTGAGCGCCTGCCTGGTGACC<br>CTGTGGGGCCTGGGCGAGCCTCCTGAGCACACCCTGAGATATCTGGTGCTTCACCTG<br>GCCAGTTTACAGCTGGGCCTGCTTCTTAACGGCGTGTGCAGCCTGGCCGAGGAGCTG<br>AGACACATCCACAGCAGATACAGAGGCAGCTACTGGAGAACCGTGAGAGCCTGCCTA<br>GGCTGCCCTCTGAGAAGAGGCGCTCTGTTGCTACTTTCCATCTACTTCTACTACTCC<br>CTGCCTAACGCCGTGGGCCCTCCTTTCACTTGGATGCTGGCGTTGCTGGGTCTGAGC<br>CAGGCCCTGAACATCCTTCTCGGTCTGAAGGGCCTGGCCCCTGCCGAGATCAGCGCC<br>GTGTGCGAGAAGGGCAACTTCAACATGGCCCACGGACTCGCCTGGAGCTACTACATC |

| | |
|---|---|
| | GGCTACCTGAGACTGATCCTGCCTGAGCTGCAGGCCAGAATCAGAACCTACAACCAG<br>CACTACAACAACCTGCTGCGGGGCGCCGTGAGCCAGAGACTGTATATACTTCTTCCT<br>CTGGACTGCGGCGTGCCTGACAACCTGAGCATGGCCGACCCTAACATCAGATTCCTG<br>GACAAGCTGCCTCAGCAGACCGGCGACCACGCCGGCATCAAGGACAGAGTGTACAGC<br>AACTCCATTTATGAGCTGCTCGAGAATGGCCAGAGAGCCGGCACCTGCGTGCTGGAG<br>TACGCCACCCCTCTGCAGACCCTGTTCGCCATGAGCCAGTACAGTCAGGCTGGATTC<br>AGCAGAGAGGACAGACTGGAGCAGGCCAAGCTGTTCTGCAGGACACTGGAGGACATA<br>CTAGCAGACGCCCCTGAGAGCCAGAACAACTGCAGACTGATTGCCTACCAGGAGCCT<br>GCGGACGACAGCTCCTTCAGTCTGAGTCAGGAGGTGTTGCGGCACTTACGCCAAGAA<br>GAGAAGGAGGAGGTGACCGTGGGCAGCCTGAAGACTAGCGCTGTGCCTAGCACCAGC<br>ACAATGTCACAGGAGCCGGAATTGCTAATCAGCGGCATGGAGAAGCCTCTCCCATTA<br>CGTACCGACTTCAGC<br>(KRAS(G12D)25mer_ct.STING(V155M)) |
| 162 | ATGCCTCACAGCAGCCTTCACCCTAGCATCCCTTGCCCTAGAGGCCACGGCGCCCAG<br>AAGGCCGCCCTAGTGCTCCTTAGCGCCTGCCTCGTGACCCTATGGGGCTTAGGCGAG<br>CCTCCAGAGCACACCTTGAGATACCTCGTCCTCCACCTGGCTAGTCTACAGCTGGGC<br>CTTCTCCTCAACGGCGTGTGCAGCCTGGCCGAGGAGCTGAGACACATCCACAGCAGA<br>TACAGAGGCAGCTACTGGAGAACCGTGAGAGCGTGCCTGGGCTGCCCTCTGAGAAGA<br>GGCGCACTGCTGTTACTCAGCATCTACTTCTACTACTCACTGCCAAACGCCGTGGGC<br>CCTCCTTTCACCTGGATGCTGGCCTTGCTCGGATTGAGCCAGGCCCTGAACATTTTA<br>CTGGGATTGAAGGGCCTGGCCCCTGCCGAGATCAGCGCCGTGTGCGAGAAGGGCAAC<br>TTCAACATGGCCCACGGCCTAGCTTGGAGCTACTACATCGGCTACCTGAGACTGATC<br>CTGCCTGAGCTGCAGGCCAGAATCAGAACCTACAACCAGCACTACAACAACCTGCTG<br>CGTGGAGCGGTGAGCCAGAGACTGTATATCCTCCTGCCTCTGGACTGCGGAGTGCCT<br>GACAACCTGAGCATGGCCGACCCTAACATCAGATTCCTGGACAAGCTGCCTCAGCAG<br>ACCGGCGACCACGCCGGCATCAAGGACAGAGTGTACAGCAACTCAATCTACGAGCTG<br>TTGGAGAATGGCCAGAGAGCCGGCACCTGCGTGCTGGAGTACGCCACCCCTCTGCAG<br>ACCCTGTTCGCCATGAGCCAGTACTCTCAGGCAGGCTTCAGCAGAGAGGACAGACTG<br>GAGCAGGCCAAGCTGTTCTGCAGAACCCTGGAGGACATCCTGGCGGACGCCCCTGAG<br>AGCCAGAACAACTGCCGGCTTATCGCCTACCAGGAGCCAGCAGACGACAGCAGCTTC<br>TCTCTCTCACAAGAGGTACTGCGCCATCTTCGCCAGGAGGAGAAGGAGGAGGTGACC<br>GTGGGCAGCCTGAAGACATCCGCCGTACCTAGCACCAGCACCATGTCTCAGGAACCG<br>GAACTGTTGATCAGCGGCATGGAGAAGCCTCTGCCACTGCGCACCGACTTCAGCGCC<br>ACCAACTTCTCCCTACTGAAGCAAGCCGGTGACGTTGAAGAGAACCCTGGCCCTATG<br>ACCGAGTACAAGCTGGTAGTAGTAGGCGCCGACGGCGTGGGCAAGAGCGCCCTGACC |

| | |
|---|---|
| | ATCCAGCTGATCCAGATGACTGAATATAAGCTTGTCGTCGTGGGCGCAGATGGCGTT<br>GGTAAGAGCGCACTTACAATTCAACTCATTCAGATGACGGAGTATAAGCTGGTGGTG<br>GTCGGAGCTGACGGCGTAGGCAAGAGTGCCCTTACTATTCAGCTAATTCAG<br>(KRAS(G12D)25mer^3_nt.STING(V155M)) |
| 163 | ATGACCGAGTACAAGCTTGTGGTGGTTGGCGCCGACGGCGTGGGCAAGAGCGCCTTA<br>ACCATCCAGCTTATCCAGATGACAGAGTATAAGCTAGTGGTGGTCGGCGCAGACGGA<br>GTGGGAAAGAGTGCATTAACTATTCAACTCATCCAAATGACCGAATACAAGCTAGTA<br>GTTGTGGGTGCAGATGGCGTCGGCAAGTCTGCACTGACAATTCAGCTCATCCAGGCC<br>ACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCCGGCGACGTGGAGGAGAACCCTGGCCCTATG<br>CCTCACAGCAGCCTGCACCCTAGCATCCCTTGCCCTAGAGGCCACGGCGCCCAGAAG<br>GCCGCCCTGGTGCTGCTGAGCGCCTGCCTGGTGACCCTGTGGGGCCTGGGCGAGCCT<br>CCTGAGCACACCCTGAGATACCTAGTTTTGCACCTGGCTTCTCTGCAGCTGGGCCTA<br>CTGCTCAACGGCGTGTGCAGCCTGGCCGAGGAGCTGAGACACATCCACAGCAGATAC<br>AGAGGCAGCTACTGGAGAACCGTGAGAGCATGCTTAGGCTGCCCTCTGAGAAGAGGC<br>GCTCTGCTCCTCTTGTCCATCTACTTCTACTACTCGCTACCTAACGCCGTGGGCCCT<br>CCTTTCACCTGGATGCTGGCCCTCTTGGGATTAAGCCAGGCCCTGAACATCTTGCTG<br>GGACTGAAGGGCCTGGCCCCTGCCGAGATCAGCGCCGTGTGCGAGAAGGGCAACTTC<br>AACATGGCCCACGGACTCGCTTGGAGCTACTACATCGGCTACCTGAGACTGATCCTG<br>CCTGAGCTGCAGGCCAGAATCAGAACCTACAACCAGCACTACAACAACCTGCTGCGG<br>GGAGCAGTGAGCCAGAGACTGTATATTCTGCTCCCTCTGGACTGCGGCGTGCCTGAC<br>AACCTGAGCATGGCCGACCCTAACATCAGATTCCTGGACAAGCTGCCTCAGCAGACC<br>GGCGACCACGCCGGCATCAAGGACAGAGTGTACAGCAACAGCATTTACGAGCTGCTG<br>GAGAACGGCCAGAGAGCCGGCACCTGCGTGCTGGAGTACGCCACCCCTCTGCAGACC<br>CTGTTCGCCATGAGCCAGTACTCCCAGGCAGGATTCAGCAGAGAGGACAGACTGGAG<br>CAGGCCAAGCTGTTCTGCCGTACTCTTGAGGACATCCTTGCAGACGCCCCTGAGAGC<br>CAGAACAACTGCCGGTTGATTGCCTACCAGGAACCGGCAGACGACAGCTCATTCTCC<br>TTGTCTCAGGAGGTCCTTAGACACCTGCGGCAGGAGGAGAAGGAGGAGGTGACCGTG<br>GGCAGCCTGAAGACATCCGCCGTGCCTAGCACGTCTACCATGTCCCAGGAGCCGGAA<br>CTGCTAATCAGCGGCATGGAGAAGCCTCTGCCTCTCAGGACCGACTTCAGC<br>(KRAS(G12D)25mer^3_ct.STING(V155M)) |
| 164 | MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTLWGLGEPPEHTLRYLVLHLASLQLG<br>LLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVRACLGCPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVG<br>PPFTWMLALLGLSQALNILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNVAHGLAWSYYIGYLRLI<br>LPELQARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFLDKLPQQ<br>TGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQTLFAMSQYSQAGFSREDkL |

| | |
|---|---|
| | EQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRHLRQEEKEEVT<br>VGSLKTSAVPSTSTMSQEPELLISGMEKPLPLRTDFST<br>(Hu STING (R284K) var; без эпитопной метки) |
| 165 | ATGCCCCATAGCAGCCTGCACCCCAGCATCCCCTGCCCCAGAGGCCACGGCGCCCAG<br>AAGGCCGCCCTGGTCCTGCTGAGCGCATGCCTGGTCACCCTGTGGGGCCTGGGCGAG<br>CCCCCCGAGCACACCCTGAGATACCTGGTGCTGCACCTCGCCAGCCTGCAGCTGGGC<br>CTGCTGCTGAACGGCGTGTGCAGCCTGGCCGAGGAGCTGAGACACATCCACAGCAGA<br>TATAGAGGCAGCTACTGGAGAACCGTGAGAGCTTGCCTCGGCTGCCCCCTGAGAAGA<br>GGCGCCCTGCTGCTGCTGAGCATCTACTTTTACTACAGCCTGCCCAACGCTGTGGGC<br>CCCCCTTTCACGTGGATGCTCGCCCTGCTGGGACTGAGCCAGGCCCTGAACATCCTG<br>CTGGGCCTTAAGGGCCTAGCCCCCGCCGAGATCAGCGCCGTGTGCGAGAAGGGCAAC<br>TTCAATGTGGCCCACGGCCTGGCCTGGAGCTACTACATCGGCTACCTGAGACTGATC<br>CTGCCCGAGCTGCAGGCCAGAATCAGAACCTACAATCAGCACTACAACAACCTGCTG<br>AGAGGCGCCGTGAGCCAGAGACTGTACATCCTGCTGCCCCTGGACTGCGGCGTGCCC<br>GACAACCTCAGCATGGCCGACCCCAACATCAGATTCCTGGACAAGCTGCCCCAGCAG<br>ACCGGCGACCACGCCGGCATCAAGGATCGCGTGTACAGCAACAGCATCTACGAGCTG<br>CTGGAAAACGGCCAGAGAGCCGGAACCTGCGTGCTGGAGTACGCCACACCCCTGCAG<br>ACCCTGTTCGCCATGAGCCAGTACAGCCAGGCCGGCTTCAGCAGAGAGGACAAGCTG<br>GAGCAGGCCAAGCTGTTCTGCAGAACCCTGGAGGATATCCTCGCCGACGCCCCCGAG<br>AGCCAGAACAACTGCAGGCTGATCGCGTACCAGGAGCCCGCTGACGACAGCAGCTTT<br>AGCCTGAGCCAGGAGGTGCTGAGACATCTGCGTCAAGAGGAAAAGGAGGAGGTGACC<br>GTGGGCTCCCTGAAGACCAGCGCCGTGCCCAGCACCAGCACCATGAGCCAGGAGCCC<br>GAGCTGCTGATCAGCGGCATGGAGAAGCCACTGCCCCTCAGAACCGACTTCAGCACC<br>(Hu STING (R284K) var; без эпитопной метки) |
| 166 | MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILD<br>TAGQEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHHYREQIKRVKDSEDVPMVLV<br>GNKCDLPSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQRVEDAFYTLVREIRQYRLKKI<br>SKEEKTPGCVKIKKC<br>Человеческие виды KRAS/P01116[1-186] |
| 167 | 5’$^{7Me}G_{ppp}G_{2',OMe}$GGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACC<br>AUGACCGAGUACAAGCUCGUGGUCGUCGGCGCCGACGGGGUAGGCAAGUCCGCUCUG<br>ACCAUUCAGCUCAUCCAGAUGACGGAGUACAAACUCGUGGUAGUGGGAGCCGUGGGU<br>GUGGGCAAGAGCGCGCUCACCAUCCAACUCAUCCAAAUGACCGAAUAUAAACUCGUC<br>GUGGUGGGAGCCGGCGACGUGGGAAAGAGCGCCCUUACCAUCCAGUUAAUCCAGAUG<br>ACAGAAUACAAGCUGGUGGUGGUCGGUGCCUGCGGCGUGGGUAAGUCCGCCCUGACA |

| | |
|---|---|
| | AUCCAGCUGAUCCAGUGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCU<br>UGGGCCUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUUGA<br>AUAAAGUCUGAGUGGGCGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAUCUAG$_{OH}$3′<br>Где: A, C G и U=АМФ, ЦМФ, ГМФ и N1-Ψ УМФ, соответственно;<br>Me=метил; p=неорганический фосфат<br>(последовательность мРНК конкатемера KRAS; CX-012908) |
| 168 | 5′$^{7Me}$G$_{ppp}$G$_{2'OMe}$GGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACC<br>AUGCCCCACAGUAGCCUCCACCCCAGCAUCCCCUGCCCCAGAGGCCACGGCGCACAG<br>AAGGCCGCCCUGGUGCUGCUGAGCGCCUGUCUGGUGACCCUGUGGGGUCUGGGCGAG<br>CCCCCCGAGCACACCCUGCGGUACCUCGUGCUGCAUCUGGCCAGCCUGCAGCUGGGC<br>CUGCUGCUGAACGGCGUGUGCAGCCUGGCCGAAGAGCUGAGACACAUCCACAGCAGA<br>UACAGAGGCUCCUACUGGAGAACCGUCAGAGCCUGCCUCGGCUGUCCCCUGAGAAGA<br>GGCGCCCUGCUGCUCCUGAGCAUCUACUUCUACUACAGCCUGCCCAACGCCGUGGGC<br>CCCCCCUUCACCUGGAUGCUGGCCCUGCUGGGCCUGAGCCAGGCCCUGAACAUCCUG<br>CUGGGCCUGAAGGGCUUGGCCCCCGCCGAGAUCUCCGCCGUGUGCGAGAAGGGCAAC<br>UUCAACAUGGCCCAUGGCCUUGCCUGGUCCUACUACAUCGGCUACCUGAGACUGAUC<br>CUGCCCGAGCUGCAGGCCAGAAUCAGAACCUACAACCAGCACUACAACAACCUGCUG<br>AGAGGCGCCGUGAGCCAAAGACUGUACAUCCUGCUGCCCCUGGACUGCGGCGUGCCC<br>GACAACCUUAGCAUGGCCGACCCCAACAUCAGAUUCCUGGACAAGCUGCCCCAGCAG<br>ACCGGCGACCACGCCGGCAUCAAGGACAGAGUGUACAGCAACAGCAUCUACGAGCUG<br>CUGGAGAACGGCCAGAGAGCCGGCACCUGCGUGCUGGAGUACGCCACCCCCCUGCAG<br>ACCCUGUUCGCCAUGAGCCAGUACAGCCAGGCCGGCUUCAGCAGAGAGGACAGACUG<br>GAGCAAGCCAAGCUGUUCUGCAGAACCCUGGAGGACAUCCUGGCGGACGCCCCCGAG<br>AGCCAAAACAACUGCAGACUGAUCGCCUACCAGGAGCCCGCCGACGACAGCAGCUUC<br>AGCCUGAGCCAGGAAGUGCUGAGACACCUGAGACAGGAAGAGAAGGAGGAGGUGACC<br>GUGGGAAGCCUGAAGACCAGCGCCGUGCCCAGCACCAGCACCAUGAGCCAGGAGCCC<br>GAGCUGCUGAUCAGCGGCAUGGAGAAGCCCCUGCCCCUGAGAACCGACUUCAGCUGA<br>UAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCCAGCCC<br>CUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCCAAACACCAUUGUCACACUCCAGUGGUCU<br>UUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAUCUAG$_{OH}$3′<br>где: A, C G и U=АМФ, ЦМФ, ГМФ и N1-Ψ УМФ, соответственно; |

| | |
|---|---|
| | Me=метил; p=неорганический фосфат; подчеркивание=сайт связывания miR-122<br>(Последовательность мРНК STING; CX-012871) |
| 169 | AUGACCGAGUACAAGCUCGUGGUCGUCGGCGCCGACGGGGUAGGCAAGUCCGCUCUG<br>ACCAUUCAGCUCAUCCAGAUGACGGAGUACAAACUCGUGGUAGUGGGAGCCGUGGGU<br>GUGGGCAAGAGCGCGCUCACCAUCCAACUCAUCCAAAUGACCGAAUAUAAACUCGUC<br>GUGGUGGGAGCCGGCGACGUGGGAAAGAGCGCCCUUACCAUCCAGUUAAUCCAGAUG<br>ACAGAAUACAAGCUGGUGGUGGUCGGUGCCUGCGGCGUGGGUAAGUCCGCCCUGACA<br>AUCCAGCUGAUCCAG<br>(нуклеотидная последовательность KRAS(G12D G12V G13D G12C) 100mer “4MUT”) |
| 170 | AUGCCCCACAGUAGCCUCCACCCCAGCAUCCCCUGCCCCAGAGGCCACGGCGCACAG<br>AAGGCCGCCCUGGUGCUGCUGAGCGCCUGUCUGGUGACCCUGUGGGGUCUGGGCGAG<br>CCCCCCGAGCACACCCUGCGGUACCUCGUGCUGCAUCUGGCCAGCCUGCAGCUGGGC<br>CUGCUGCUGAACGGCGUGUGCAGCCUGGCCGAAGAGCUGAGACACAUCCACAGCAGA<br>UACAGAGGCUCCUACUGGAGAACCGUCAGAGCCUGCCUCGGCUGUCCCCUGAGAAGA<br>GGCGCCCUGCUGCUCCUGAGCAUCUACUUCUACUACAGCCUGCCCAACGCCGUGGGC<br>CCCCCCUUCACCUGGAUGCUGGCCCUGCUGGGCCUGAGCCAGGCCCUGAACAUCCUG<br>CUGGGCCUGAAGGGCUUGGCCCCCGCCGAGAUCUCCGCCGUGUGCGAGAAGGGCAAC<br>UUCAACAUGGCCCAUGGCCUUGCCUGGUCCUACUACAUCGGCUACCUGAGACUGAUC<br>CUGCCCGAGCUGCAGGCCAGAAUCAGAACCUACAACCAGCACUACAACAACCUGCUG<br>AGAGGCGCCGUGAGCCAAAGACUGUACAUCCUGCUGCCCCUGGACUGCGGCGUGCCC<br>GACAACCUUAGCAUGGCCGACCCCAACAUCAGAUUCCUGGACAAGCUGCCCCAGCAG<br>ACCGGCGACCACGCCGGCAUCAAGGACAGAGUGUACAGCAACAGCAUCUACGAGCUG<br>CUGGAGAACGGCCAGAGAGCCGGCACCUGCGUGCUGGAGUACGCCACCCCCCUGCAG<br>ACCCUGUUCGCCAUGAGCCAGUACAGCCAGGCCGGCUUCAGCAGAGAGGACAGACUG<br>GAGCAAGCCAAGCUGUUCUGCAGAACCCUGGAGGACAUCCUGGCGGACGCCCCCGAG<br>AGCCAAAACAACUGCAGACUGAUCGCCUACCAGGAGCCCGCCGACGACAGCAGCUUC<br>AGCCUGAGCCAGGAAGUGCUGAGACACCUGAGACAGGAAGAGAAGGAGGAGGUGACC<br>GUGGGAAGCCUGAAGACCAGCGCCGUGCCCAGCACCAGCACCAUGAGCCAGGAGCCC<br>GAGCUGCUGAUCAGCGGCAUGGAGAAGCCCCUGCCCCUGAGAACCGACUUCAGC<br>(huSTING(V155M); без эпитопной метки; нуклеотидная последовательность) |
| 171 | CCUUAGCAGAGCUGUGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGUGUCUAAACUAUCAAACGCCA<br>UUAUCACACUAAAUAGCUACUGCUAGGC |

| | |
|---|---|
| | (mir-122) |
| 172 | AACGCCAUUAUCACACUAAAUA (mir-122-3p_ |
| 173 | UAUUUAGUGUGAUAAUGGCGUU (сайт связывания mir-122-3p) |
| 174 | UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG (mir-122-5p) |
| 175 | CAAACACCAUUGUCACACUCCA (сайт связывания mir-122-5p) |
| 176 | GGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACC (5′-HTO) |
| 177 | CCGCCGCCGCCG |
| 178 | CCGCCGCCGCCGCCG |
| 179 | CCCCGGCGCC (V1) |
| 180 | GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGA (5′-HTO) |
| 181 | GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGACCCCGGCGCCGCCACC (V1-HTO) |
| 182 | GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGACCCCGGCGCCACC (V2-HTO) |
| 183 | MKLVVVGACGVGKSAMKLVVVGACGVGKSAMKLVVVGACGVGKSA (KRAS G12C 15mer^3) |
| 184 | ATGACCGAGTACAAGCTCGTGGTTGTTGGCGCCTGCGGCGTGGGCAAGAGCGCCCTC ACCATCCAGCTCATCCAGATGACAGAGTATAAGTTAGTCGTTGTCGGAGCTTGCGGA GTTGGAAAGTCGGCGCTCACCATTCAACTCATACAAATGACAGAATATAAGTTAGTG GTGGTGGGTGCGTGTGGCGTTGGCAAGAGTGCGCTTACTATCCAGCTCATTCAG (Нуклеотидная последовательность KRAS G12C 25mer^3) |
| 185 | UCAAGCUUUUGGACCCUCGUACAGAAGCUAAUACGACUCACUAUAGGGAAAUAAGAG AGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACC (5′-HTO) |
| 186 | UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCCAG CCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGG GCGGC (3′-HTO) |
| 187 | UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCCAAACACCA UUGUCACACUCCAUCCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUCCUCCAUAAAGUAGGAAACAC UACAUGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (3′-HTO с сайтами mi-122 и mi-142.3p) |
| 188 | GGAAGCGGAGCUACUAACUUCAGCCUGCUGAAGCAGGCUGGAGACGUGGAGGAGAAC CCUGGACCU |

| | |
|---|---|
| | (Нуклеотидная последовательность, кодирующая пептид 2A) |
| 189 | UCCGGACUCAGAUCCGGGGAUCUCAAAAUUGUCGCUCCUGUCAAACAAACUCUUAAC<br>UUUGAUUUACUCAAACUGGCUGGGGAUGUAGAAAGCAAUCCAGGUCCACUC<br>(Нуклеотидная последовательность, кодирующая пептид 2A) |
| 190 | AUGACCGAGUACAAGCUGGUGGUGGUGGGCGCCGACGGCGUGGGCAAGAGCGCCCUG<br>ACCAUCCAGCUGAUCCAG<br>(Нуклеотидная последовательность KRAS G12D 25mer) |
| 191 | AUGACCGAGUACAAGCUGGUGGUGGUGGGCGCCGUGGGCGUGGGCAAGAGCGCCCUG<br>ACCAUCCAGCUGAUCCAG<br>(Нуклеотидная последовательность KRAS G12V 25mer) |
| 192 | AUGACCGAGUACAAGCUGGUGGUGGUGGGCGCCGGCGACGUGGGCAAGAGCGCCCUG<br>ACCAUCCAGCUGAUCCAG<br>(Нуклеотидная последовательность KRAS G13D 25mer) |
| 193 | AUGACCGAGUACAAGUUAGUGGUUGUGGGCGCCGACGGCGUGGGCAAGAGCGCCCUC<br>ACCAUCCAGCUUAUCCAGAUGACGGAAUAUAAGUUAGUAGUAGUGGGAGCCGACGGU<br>GUCGGCAAGUCCGCUUUGACCAUUCAACUUAUUCAGAUGACAGAGUAUAAGCUGGUC<br>GUUGUAGGCGCAGACGGCGUUGGAAAGUCGGCACUGACGAUCCAGUUGAUCCAG<br>(Нуклеотидная последовательность KRAS G12D 25mer^3) |
| 194 | AUGACCGAGUACAAGCUCGUCGUGGUGGGCGCCGUGGGCGUGGGCAAGAGCGCCCUA<br>ACCAUCCAGUUGAUCCAGAUGACCGAAUAUAAGCUCGUGGUAGUCGGAGCGGUGGGC<br>GUUGGCAAGUCAGCGCUAACAAUACAACUAAUCCAAAUGACCGAAUACAAGCUAGUU<br>GUAGUCGGUGCCGUCGGCGUUGGAAAGUCAGCCCUUACAAUUCAGCUCAUUCAG<br>(Нуклеотидная последовательность KRAS G12V 25mer^3) |
| 195 | AUGACCGAGUACAAGCUCGUAGUGGUUGGCGCCGGCGACGUGGGCAAGAGCGCCCUA<br>ACCAUCCAGCUCAUCCAGAUGACAGAAUAUAAGCUUGUGGUUGUGGGAGCAGGAGAC<br>GUGGGAAAGAGUGCGUUGACGAUUCAACUCAUACAGAUGACCGAAUACAAGUUGGUG<br>GUGGUCGGCGCAGGUGACGUUGGUAAGUCUGCACUAACUAUACAACUGAUCCAG<br>(Нуклеотидная последовательность KRAS G13D 25mer^3) |
| 196 | AUGACCGAGUACAAGCUGGUGGUGGUGGGCGCCUGCGGCGUGGGCAAGAGCGCCCUG<br>ACCAUCCAGCUGAUCCAG<br>(Нуклеотидная последовательность KRAS G12C 25mer) |
| 197 | AUGACCGAGUACAAGCUCGUGGUUGUUGGCGCCUGCGGCGUGGGCAAGAGCGCCCUC<br>ACCAUCCAGCUCAUCCAGAUGACAGAGUAUAAGUUAGUCGUUGUCGGAGCUUGCGGA<br>GUUGGAAAGUCGGCGCUCACCAUUCAACUCAUACAAAUGACAGAAUAUAAGUUAGUG<br>GUGGUGGGUGCGUGUGGCGUUGGCAAGAGUGCGCUUACUAUCCAGCUCAUUCAG |

| | |
|---|---|
| | (Нуклеотидная последовательность KRAS G12C 25mer^3) |
| 198 | AUGACCGAGUACAAGCUGGUGGUGGUGGGCGCCGGCGGCGUGGGCAAGAGCGCCCUG<br>ACCAUCCAGCUGAUCCAG<br>(Нуклеотидная последовательность KRAS WT 25mer) |
| 199 | GGGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACC<br>(последовательность 5′-HTO; без промотора) |
| 200 | AUGACCGAGUACAAGCUCGUUGUAGUCGGCGCCGACGGCGUGGGCAAGAGCGCCUUG<br>ACCAUCCAGUUGAUCCAGAUGACCGAAUAUAAGUUGGUGGUGGUAGGCGCAGUGGGA<br>GUUGGCAAGUCAGCACUCACAAUUCAGCUCAUUCAAAUGACAGAAUACAAGUUAGUC<br>GUUGUAGGAGCAGGCGACGUCGGCAAGAGUGCCUUAACCAUUCAACUAAUCCAG<br>(нуклеотидная последовательность KRAS(G12D G12V G13D) 75mer “3MUT”) |
| 201 | AUGCCUCACAGCAGCCUGCACCCUAGCAUCCCUUGCCCUAGAGGCCACGGCGCCCAG<br>AAGGCCGCCCUGGUGCUGCUGAGCGCCUGCCUGGUGACCCUGUGGGGCCUGGGCGAG<br>CCUCCUGAGCACACCCUGAGAUACCUGGUGCUGCACCUGGCCAGCCUGCAGCUGGGC<br>CUGCUGCUGAACGGCGUGUGCAGCCUGGCCGAGGAGCUGAGACACAUCCACAGCAGA<br>UACAGAGGCAGCUACUGGAGAACCGUGAGAGCCUGCCUGGGCUGCCCUCUGAGAAGA<br>GGCGCCCUGCUGCUGCUGAGCAUCUACUUCUACUACAGCCUGCCUAACGCCGUGGGC<br>CCUCCUUUCACCUGGAUGCUGGCCCUGCUGGGCCUGAGCCAGGCCCUGAACAUCCUG<br>CUGGGCCUGAAGGGCCUGGCCCCUGCCGAGAUCAGCGCCGUGUGCGAGAAGGGCAAC<br>UUCAACGUGGCCCACGGCCUGGCCUGGAGCUACUACAUCGGCUACCUGAGACUGAUC<br>CUGCCUGAGCUGCAGGCCAGAAUCAGAACCUACAACCAGCACUACAACAACCUGCUG<br>AGAGGCGCCGUGAGCCAGAGACUGUACAUCCUGCUGCCUCUGGACUGCGGCGUGCCU<br>GACAACCUGAGCAUGGCCGACCCUAACAUCAGAUUCCUGGACAAGCUGCCUCAGCAG<br>ACCGGCGACCACGCCGGCAUCAAGGACAGAGUGUACAGCAACAGCAUCUACGAGCUG<br>CUGGAGAACGGCCAGAGAGCCGGCACCUGCGUGCUGGAGUACGCCACCCCUCUGCAG<br>ACCCUGUUCGCCAUGAGCCAGUACAGCCAGGCCGGCUUCAGCAGAGAGGACACCCUG<br>GAGCAGGCCAAGCUGUUCUGCAGAACCCUGGAGGACAUCCUGGCCGACGCCCCUGAG<br>AGCCAGAACAACUGCAGACUGAUCGCCUACCAGGAGCCUGCCGACGACAGCAGCUUC<br>AGCCUGAGCCAGGAGGUGCUGAGACACCUGAGACAGGAGGAGAAGGAGGAGGUGACC<br>GUGGGCAGCCUGAAGACCAGCGCCGUGCCUAGCACCAGCACCAUGAGCCAGGAGCCU<br>GAGCUGCUGAUCAGCGGCAUGGAGAAGCCUCUGCCUCUGAGAACCGACUUCAGC<br>(Hu STING(R284T); без эпитопной метки; нуклеотидная последовательность) |
| 202 | AUGCCCCACAGCAGCCUGCACCCCUCCAUCCCCUGUCCCAGAGGCCACGGCGCCCAG |

| | |
|---|---|
| | AAGGCCGCCCUGGUGCUGCUGAGCGCCUGCCUGGUGACCUUAUGGGGCCUGGGCGAG<br>CCCCCCGAGCACACCCUGAGAUACCUGGUCCUGCACCUGGCCAGCCUCCAGCUGGGC<br>CUGCUGCUCAACGGCGUGUGUAGCCUGGCCGAGGAGCUGAGACACAUCCACAGCAGA<br>UACAGAGGCAGCUACUGGAGAACCGUGAGAGCCUGCCUGGGUUGCCCACUGAGAAGA<br>GGAGCUCUGCUGCUGCUGAGCAUCUACUUCUACUACUCGCUGCCCAACGCUGUGGGC<br>CCCCCCUUCACCUGGAUGCUGGCCCUGCUGGGUCUGAGCCAGGCCCUGAACAUCCUC<br>CUGGGCCUGAAGGGCCUGGCCCCCGCCGAGAUAAGCGCCGUUUGCGAGAAGGGCAAC<br>UUCAACGUGGCCCAUGGCCUGGCCUGGAGCUACUACAUCGGCUACUUACGCCUGAUC<br>CUGCCCGAGCUGCAGGCCAGAAUCAGAACCUACAACCAGCAUUACAACAACCUGCUG<br>AGAGGCGCCGUGAGCCAGAGACUGUAUAUCCUGCUGCCCCUGGACUGCGGCGUGCCC<br>GACAACCUGAGCAUGGCCGACCCCAACAUCAGAUUCCUGGACAAGCUCCCCCAGCAG<br>ACCGGCGACCACGCCGGAAUCAAAGACAGAGUGUAUAGCAACAGCAUCUACGAGCUG<br>CUGGAGAACGGCCAGAGAGCCGGCACCUGCGUACUGGAGUACGCCACCCCCUUGCAG<br>ACCCUGUUUGCCAUGAGCCAGUACAGCCAGGCCGGCUUCAGCAGAGAGGACAUGCUG<br>GAGCAGGCCAAGCUGUUCUGCAGAACCCUGGAGGACAUCCUGGCCGACGCCCCCGAG<br>AGCCAGAACAACUGCAGACUGAUCGCCUACCAAGAGCCCGCCGACGACAGCAGCUUC<br>AGCUUAAGCCAGGAGGUGCUGAGACAUCUGAGACAGGAGGAGAAGGAGGAGGUGACC<br>GUGGGCAGCCUCAAGACCAGCGCUGUGCCCUCUACCAGCACCAUGAGCCAGGAGCCC<br>GAGCUGCUGAUCAGCGGCAUGGAGAAGCCCCUGCCCCUGAGAACAGACUUCAGC<br>(hu STING (R284M); без эпитопной метки; нуклеотидная последовательность) |
| 203 | AUGCCCCAUAGCAGCCUGCACCCCAGCAUCCCCUGCCCCAGAGGCCACGGCGCCCAG<br>AAGGCCGCCCUGGUCCUGCUGAGCGCAUGCCUGGUCACCCUGUGGGGCCUGGGCGAG<br>CCCCCCGAGCACACCCUGAGAUACCUGGUGCUGCACCUCGCCAGCCUGCAGCUGGGC<br>CUGCUGCUGAACGGCGUGUGCAGCCUGGCCGAGGAGCUGAGACACAUCCACAGCAGA<br>UAUAGAGGCAGCUACUGGAGAACCGUGAGAGCUUGCCUCGGCUGCCCCCUGAGAAGA<br>GGCGCCCUGCUGCUGCUGAGCAUCUACUUUUACUACAGCCUGCCCAACGCUGUGGGC<br>CCCCCUUUCACGUGGAUGCUCGCCCUGCUGGGACUGAGCCAGGCCCUGAACAUCCUG<br>CUGGGCCUUAAGGGCCUAGCCCCCGCCGAGAUCAGCGCCGUGUGCGAGAAGGGCAAC<br>UUCAAUGUGGCCCACGGCCUGGCCUGGAGCUACUACAUCGGCUACCUGAGACUGAUC<br>CUGCCCGAGCUGCAGGCCAGAAUCAGAACCUACAAUCAGCACUACAACAACCUGCUG<br>AGAGGCGCCGUGAGCCAGAGACUGUACAUCCUGCUGCCCCUGGACUGCGGCGUGCCC<br>GACAACCUCAGCAUGGCCGACCCCAACAUCAGAUUCCUGGACAAGCUGCCCCAGCAG<br>ACCGGCGACCACGCCGGCAUCAAGGAUCGCGUGUACAGCAACAGCAUCUACGAGCUG<br>CUGGAAAACGGCCAGAGAGCCGGAACCUGCGUGCUGGAGUACGCCACACCCCUGCAG |

| | |
|---|---|
| | ACCCUGUUCGCCAUGAGCCAGUACAGCCAGGCCGGCUUCAGCAGAGAGGACAAGCUG<br>GAGCAGGCCAAGCUGUUCUGCAGAACCCUGGAGGAUAUCCUCGCCGACGCCCCCGAG<br>AGCCAGAACAACUGCAGGCUGAUCGCGUACCAGGAGCCCGCUGACGACAGCAGCUUU<br>AGCCUGAGCCAGGAGGUGCUGAGACAUCUGCGUCAAGAGGAAAAGGAGGAGGUGACC<br>GUGGGCUCCCUGAAGACCAGCGCCGUGCCCAGCACCAGCACCAUGAGCCAGGAGCCC<br>GAGCUGCUGAUCAGCGGCAUGGAGAAGCCACUGCCCCUCAGAACCGACUUCAGC<br>(Hu STING (R284K); без эпитопной метки; нуклеотидная последовательность) |
| 204 | AUGCCUCACAGCAGCCUGCACCCUAGCAUCCCUUGCCCUAGAGGCCACGGCGCCCAG<br>AAGGCCGCCCUGGUGCUGCUGAGCGCCUGCCUGGUGACCCUGUGGGGCCUGGGCGAG<br>CCUCCUGAGCACACCCUGAGAUACCUGGUGCUGCACCUGGCCAGCCUGCAGCUGGGC<br>CUGCUGCUGAACGGCGUGUGCAGCCUGGCCGAGGAGCUGAGACACAUCCACAGCAGA<br>UACAGAGGCAGCUACUGGAGAACCGUGAGAGCCUGCCUGGGCUGCCCUCUGAGAAGA<br>GGCGCCCUGCUGCUGCUGAGCAUCUACUUCUACUACAGCCUGCCUAACGCCGUGGGC<br>CCUCCUUUCACCUGGAUGCUGGCCCUGCUGGGCCUGAGCCAGGCCCUGAACAUCCUG<br>CUGGGCCUGAAGGGCCUGGCCCCUGCCGAGAUCAGCGCCGUGUGCGAGAAGGGCAAC<br>UUCAGCGUGGCCCACGGCCUGGCCUGGAGCUACUACAUCGGCUACCUGAGACUGAUC<br>CUGCCUGAGCUGCAGGCCAGAAUCAGAACCUACAACCAGCACUACAACAACCUGCUG<br>AGAGGCGCCGUGAGCCAGAGACUGUACAUCCUGCUGCCUCUGGACUGCGGCGUGCCU<br>GACAACCUGAGCAUGGCCGACCCUAACAUCAGAUUCCUGGACAAGCUGCCUCAGCAG<br>ACCGGCGACCACGCCGGCAUCAAGGACAGAGUGUACAGCAACAGCAUCUACGAGCUG<br>CUGGAGAACGGCCAGAGAGCCGGCACCUGCGUGCUGGAGUACGCCACCCCUCUGCAG<br>ACCCUGUUCGCCAUGAGCCAGUACAGCCAGGCCGGCUUCAGCAGAGAGGACAGACUG<br>GAGCAGGCCAAGCUGUUCUGCAGAACCCUGGAGGACAUCCUGGCCGACGCCCCUGAG<br>AGCCAGAACAACUGCAGACUGAUCGCCUACCAGGAGCCUGCCGACGACAGCAGCUUC<br>AGCCUGAGCCAGGAGGUGCUGAGACACCUGAGACAGGAGGAGAAGGAGGAGGUGACC<br>GUGGGCAGCCUGAAGACCAGCGCCGUGCCUAGCACCAGCACCAUGAGCCAGGAGCCU<br>GAGCUGCUGAUCAGCGGCAUGGAGAAGCCUCUGCCUCUGAGAACCGACUUCAGC<br>(Hu STING(N154S); без эпитопной метки; нуклеотидная последовательность) |
| 205 | AUGCCUCACAGCAGCCUGCACCCUAGCAUCCCUUGCCCUAGAGGCCACGGCGCCCAG<br>AAGGCCGCCCUGGUGCUGCUGAGCGCCUGCCUGGUGACCCUGUGGGGCCUGGGCGAG<br>CCUCCUGAGCACACCCUGAGAUACCUGGUGCUGCACCUGGCCAGCCUGCAGCUGGGC<br>CUGCUGCUGAACGGCGUGUGCAGCCUGGCCGAGGAGCUGAGACACAUCCACAGCAGA<br>UACAGAGGCAGCUACUGGAGAACCGUGAGAGCCUGCCUGGGCUGCCCUCUGAGAAGA |

| | |
|---|---|
| | GGCGCCCUGCUGCUGCUGAGCAUCUACUUCUACUACAGCCUGCCUAACGCCGUGGGC<br>CCUCCUUUCACCUGGAUGCUGGCCCUGCUGGGCCUGAGCCAGGCCCUGAACAUCCUG<br>CUGGGCCUGAAGGGCCUGGCCCCUGCCGAGAUCAGCGCCCUGUGCGAGAAGGGCAAC<br>UUCAACGUGGCCCACGGCCUGGCCUGGAGCUACUACAUCGGCUACCUGAGACUGAUC<br>CUGCCUGAGCUGCAGGCCAGAAUCAGAACCUACAACCAGCACUACAACAACCUGCUG<br>AGAGGCGCCGUGAGCCAGAGACUGUACAUCCUGCUGCCUCUGGACUGCGGCGUGCCU<br>GACAACCUGAGCAUGGCCGACCCUAACAUCAGAUUCCUGGACAAGCUGCCUCAGCAG<br>ACCGGCGACCACGCCGGCAUCAAGGACAGAGUGUACAGCAACAGCAUCUACGAGCUG<br>CUGGAGAACGGCCAGAGAGCCGGCACCUGCGUGCUGGAGUACGCCACCCCUCUGCAG<br>ACCCUGUUCGCCAUGAGCCAGUACAGCCAGGCCGGCUUCAGCAGAGAGGACAGACUG<br>GAGCAGGCCAAGCUGUUCUGCAGAACCCUGGAGGACAUCCUGGCCGACGCCCCUGAG<br>AGCCAGAACAACUGCAGACUGAUCGCCUACCAGGAGCCUGCCGACGACAGCAGCUUC<br>AGCCUGAGCCAGGAGGUGCUGAGACACCUGAGACAGGAGGAGAAGGAGGAGGUGACC<br>GUGGGCAGCCUGAAGACCAGCGCCGUGCCUAGCACCAGCACCAUGAGCCAGGAGCCU<br>GAGCUGCUGAUCAGCGGCAUGGAGAAGCCUCUGCCUCUGAGAACCGACUUCAGC<br>(Hu STING(V147L); без эпитопной метки; нуклеотидная последовательность) |
| 206 | AUGCCUCACAGCAGCCUGCACCCUAGCAUCCCUUGCCCUAGAGGCCACGGCGCCCAG<br>AAGGCCGCCCUGGUGCUGCUGAGCGCCUGCCUGGUGACCCUGUGGGGCCUGGGCGAG<br>CCUCCUGAGCACACCCUGAGAUACCUGGUGCUGCACCUGGCCAGCCUGCAGCUGGGC<br>CUGCUGCUGAACGGCGUGUGCAGCCUGGCCGAGGAGCUGAGACACAUCCACAGCAGA<br>UACAGAGGCAGCUACUGGAGAACCGUGAGAGCCUGCCUGGGCUGCCCUCUGAGAAGA<br>GGCGCCCUGCUGCUGCUGAGCAUCUACUUCUACUACAGCCUGCCUAACGCCGUGGGC<br>CCUCCUUUCACCUGGAUGCUGGCCCUGCUGGGCCUGAGCCAGGCCCUGAACAUCCUG<br>CUGGGCCUGAAGGGCCUGGCCCCUGCCGAGAUCAGCGCCGUGUGCGAGAAGGGCAAC<br>UUCAACGUGGCCCACGGCCUGGCCUGGAGCUACUACAUCGGCUACCUGAGACUGAUC<br>CUGCCUGAGCUGCAGGCCAGAAUCAGAACCUACAACCAGCACUACAACAACCUGCUG<br>AGAGGCGCCGUGAGCCAGAGACUGUACAUCCUGCUGCCUCUGGACUGCGGCGUGCCU<br>GACAACCUGAGCAUGGCCGACCCUAACAUCAGAUUCCUGGACAAGCUGCCUCAGCAG<br>ACCGGCGACCACGCCGGCAUCAAGGACAGAGUGUACAGCAACAGCAUCUACGAGCUG<br>CUGGAGAACGGCCAGAGAGCCGGCACCUGCGUGCUGGAGUACGCCACCCCUCUGCAG<br>ACCCUGUUCGCCAUGAGCCAGUACAGCCAGGCCGGCUUCAGCAGAGAGGACAGACUG<br>GAGCAGGCCAAGCUGUUCUGCAGAACCCUGGAGGACAUCCUGGCCGACGCCCCUGAG<br>AGCCAGAACAACUGCAGACUGAUCGCCUACCAGCAGCCUGCCGACGACAGCAGCUUC<br>AGCCUGAGCCAGGAGGUGCUGAGACACCUGAGACAGGAGGAGAAGGAGGAGGUGACC |

| | |
|---|---|
| | GUGGGCAGCCUGAAGACCAGCGCCGUGCCUAGCACCAGCACCAUGAGCCAGGAGCCU<br>GAGCUGCUGAUCAGCGGCAUGGAGAAGCCUCUGCCUCUGAGAACCGACUUCAGC<br>(Hu STING (E315Q); без эпитопной метки; нуклеотидная последовательность) |
| 207 | AUGCCUCACAGCAGCCUGCACCCUAGCAUCCCUUGCCCUAGAGGCCACGGCGCCCAG<br>AAGGCCGCCCUGGUGCUGCUGAGCGCCUGCCUGGUGACCCUGUGGGGCCUGGGCGAG<br>CCUCCUGAGCACACCCUGAGAUACCUGGUGCUGCACCUGGCCAGCCUGCAGCUGGGC<br>CUGCUGCUGAACGGCGUGUGCAGCCUGGCCGAGGAGCUGAGACACAUCCACAGCAGA<br>UACAGAGGCAGCUACUGGAGAACCGUGAGAGCCUGCCUGGGCUGCCCUCUGAGAAGA<br>GGCGCCCUGCUGCUGCUGAGCAUCUACUUCUACUACAGCCUGCCUAACGCCGUGGGC<br>CCUCCUUUCACCUGGAUGCUGGCCCUGCUGGGCCUGAGCCAGGCCCUGAACAUCCUG<br>CUGGGCCUGAAGGGCCUGGCCCCUGCCGAGAUCAGCGCCGUGUGCGAGAAGGGCAAC<br>UUCAACGUGGCCCACGGCCUGGCCUGGAGCUACUACAUCGGCUACCUGAGACUGAUC<br>CUGCCUGAGCUGCAGGCCAGAAUCAGAACCUACAACCAGCACUACAACAACCUGCUG<br>AGAGGCGCCGUGAGCCAGAGACUGUACAUCCUGCUGCCUCUGGACUGCGGCGUGCCU<br>GACAACCUGAGCAUGGCCGACCCUAACAUCAGAUUCCUGGACAAGCUGCCUCAGCAG<br>ACCGGCGACCACGCCGGCAUCAAGGACAGAGUGUACAGCAACAGCAUCUACGAGCUG<br>CUGGAGAACGGCCAGAGAGCCGGCACCUGCGUGCUGGAGUACGCCACCCCUCUGCAG<br>ACCCUGUUCGCCAUGAGCCAGUACAGCCAGGCCGGCUUCAGCAGAGAGGACAGACUG<br>GAGCAGGCCAAGCUGUUCUGCAGAACCCUGGAGGACAUCCUGGCCGACGCCCCUGAG<br>AGCCAGAACAACUGCAGACUGAUCGCCUACCAGGAGCCUGCCGACGACAGCAGCUUC<br>AGCCUGAGCCAGGAGGUGCUGAGACACCUGAGACAGGAGGAGAAGGAGGAGGUGACC<br>GUGGGCAGCCUGAAGACCAGCGCCGUGCCUAGCACCAGCACCAUGAGCCAGGAGCCU<br>GAGCUGCUGAUCAGCGGCAUGGAGAAGCCUCUGCCUCUGGCCACCGACUUCAGC<br>(Hu STING (R375A); без эпитопной метки; нуклеотидная последовательность) |
| 208 | AUGCCUCACAGCAGCCUGCACCCUAGCAUCCCUUGCCCUAGAGGCCACGGCGCCCAG<br>AAGGCCGCCCUGGUGCUGCUGAGCGCCUGCCUGGUGACCCUGUGGGGCCUGGGCGAG<br>CCUCCUGAGCACACCCUGAGAUACCUGGUGCUGCACCUGGCCAGCCUGCAGCUGGGC<br>CUGCUGCUGAACGGCGUGUGCAGCCUGGCCGAGGAGCUGAGACACAUCCACAGCAGA<br>UACAGAGGCAGCUACUGGAGAACCGUGAGAGCCUGCCUGGGCUGCCCUCUGAGAAGA<br>GGCGCCCUGCUGCUGCUGAGCAUCUACUUCUACUACAGCCUGCCUAACGCCGUGGGC<br>CCUCCUUUCACCUGGAUGCUGGCCCUGCUGGGCCUGAGCCAGGCCCUGAACAUCCUG<br>CUGGGCCUGAAGGGCCUGGCCCCUGCCGAGAUCAGCGCCCUGUGCGAGAAGGGCAAC<br>UUCAGCAUGGCCCACGGCCUGGCCUGGAGCUACUACAUCGGCUACCUGAGACUGAUC |

| | |
|---|---|
| | CUGCCUGAGCUGCAGGCCAGAAUCAGAACCUACAACCAGCACUACAACAACCUGCUG<br>AGAGGCGCCGUGAGCCAGAGACUGUACAUCCUGCUGCCUCUGGACUGCGGCGUGCCU<br>GACAACCUGAGCAUGGCCGACCCUAACAUCAGAUUCCUGGACAAGCUGCCUCAGCAG<br>ACCGGCGACCACGCCGGCAUCAAGGACAGAGUGUACAGCAACAGCAUCUACGAGCUG<br>CUGGAGAACGGCCAGAGAGCCGGCACCUGCGUGCUGGAGUACGCCACCCCUCUGCAG<br>ACCCUGUUCGCCAUGAGCCAGUACAGCCAGGCCGGCUUCAGCAGAGAGGACAGACUG<br>GAGCAGGCCAAGCUGUUCUGCAGAACCCUGGAGGACAUCCUGGCCGACGCCCCUGAG<br>AGCCAGAACAACUGCAGACUGAUCGCCUACCAGGAGCCUGCCGACGACAGCAGCUUC<br>AGCCUGAGCCAGGAGGUGCUGAGACACCUGAGACAGGAGGAGAAGGAGGAGGUGACC<br>GUGGGCAGCCUGAAGACCAGCGCCGUGCCUAGCACCAGCACCAUGAGCCAGGAGCCU<br>GAGCUGCUGAUCAGCGGCAUGGAGAAGCCUCUGCCUCUGAGAACCGACUUCAGC<br>(Hu STING(V147L/N154S/V155M); без эпитопной метки; нуклеотидная последовательность) |
| 209 | AUGCCUCACAGCAGCCUGCACCCUAGCAUCCCUUGCCCUAGAGGCCACGGCGCCCAG<br>AAGGCCGCCCUGGUGCUGCUGAGCGCCUGCCUGGUGACCCUGUGGGGCCUGGGCGAG<br>CCUCCUGAGCACACCCUGAGAUACCUGGUGCUGCACCUGGCCAGCCUGCAGCUGGGC<br>CUGCUGCUGAACGGCGUGUGCAGCCUGGCCGAGGAGCUGAGACACAUCCACAGCAGA<br>UACAGAGGCAGCUACUGGAGAACCGUGAGAGCCUGCCUGGGCUGCCCUCUGAGAAGA<br>GGCGCCCUGCUGCUGCUGAGCAUCUACUUCUACUACAGCCUGCCUAACGCCGUGGGC<br>CCUCCUUUCACCUGGAUGCUGGCCCUGCUGGGCCUGAGCCAGGCCCUGAACAUCCUG<br>CUGGGCCUGAAGGGCCUGGCCCCUGCCGAGAUCAGCGCCCUGUGCGAGAAGGGCAAC<br>UUCAGCAUGGCCCACGGCCUGGCCUGGAGCUACUACAUCGGCUACCUGAGACUGAUC<br>CUGCCUGAGCUGCAGGCCAGAAUCAGAACCUACAACCAGCACUACAACAACCUGCUG<br>AGAGGCGCCGUGAGCCAGAGACUGUACAUCCUGCUGCCUCUGGACUGCGGCGUGCCU<br>GACAACCUGAGCAUGGCCGACCCUAACAUCAGAUUCCUGGACAAGCUGCCUCAGCAG<br>ACCGGCGACCACGCCGGCAUCAAGGACAGAGUGUACAGCAACAGCAUCUACGAGCUG<br>CUGGAGAACGGCCAGAGAGCCGGCACCUGCGUGCUGGAGUACGCCACCCCUCUGCAG<br>ACCCUGUUCGCCAUGAGCCAGUACAGCCAGGCCGGCUUCAGCAGAGAGGACAUGCUG<br>GAGCAGGCCAAGCUGUUCUGCAGAACCCUGGAGGACAUCCUGGCCGACGCCCCUGAG<br>AGCCAGAACAACUGCAGACUGAUCGCCUACCAGGAGCCUGCCGACGACAGCAGCUUC<br>AGCCUGAGCCAGGAGGUGCUGAGACACCUGAGACAGGAGGAGAAGGAGGAGGUGACC<br>GUGGGCAGCCUGAAGACCAGCGCCGUGCCUAGCACCAGCACCAUGAGCCAGGAGCCU<br>GAGCUGCUGAUCAGCGGCAUGGAGAAGCCUCUGCCUCUGAGAACCGACUUCAGC<br>(Hu STING(R284M/V147L/N154S/V155M); без эпитопной метки; нуклеотидная последовательность) |

| | |
|---|---|
| 210 | UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCUAGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCCAG<br>CCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCCAAACACCAUUGUCACACUCCAGUGG<br>UCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC<br>(3'-HTO, используемая в конструкте STING V155M, содержащем сайт связывания miR122) |
| 211 | AUGGAGACCCCCAAGCCUAGAAUCCUGCCCUGGCUGGUGAGCCAGCUGGACCUGGGC<br>CAGCUGGAGGGCGUAGCCUGGCUGGACGAGAGCAGAACCAGAUUCAGAAUCCCCUGG<br>AAGCACGGCCUGAGACAAGACGCCCAGAUGGCCGACUUCGGCAUCUUCCAGGCCUGG<br>GCCGAGGCCAGCGGCGCCUACACCCCUGGCAAGGAUAAGCCCGAUGUGAGCACCUGG<br>AAGAGAAACUUCAGAAGCGCCCUGAACAGAAAGGAGGUGCUGAGACUGGCCGCCGAC<br>AAUAGCAAGGACCCCUACGACCCCCACAAGGUGUACGAGUUCGUUACCCCCGGCGCC<br>AGGGACUUCGUGCACCUGGGCGCCAGCCCCGACACCAACGGCAAGAGCAGCCUGCCC<br>CACAGCCAGGAGAACCUGCCCAAGCUGUUCGAUGGCCUGAUCCUGGGCCCCCUGAAG<br>GACGAGGGCAGCAGCGACCUGGCCAUCGUGAGCGACCCUAGCCAGCAGCUGCCCUCC<br>CCCAACGUGAACAACUUCCUGAACCCCGCCCCCCAGGAGAACCCCCUGAAGCAACUG<br>CUGGCCGAGGAGCAGUGGGAGUUCGAGGUGACCGCCUUCUACAGAGGCAGACAGGUG<br>UUCCAGCAGACCCUGUUCUGCCCCGGCGGCCUGAGACUGGUAGGCAGCACCGCUGAC<br>AUGACCCUGCCCUGGCAGCCCGUGACCCUGCCCGACCCCGAAGGCUUUCUGACCGAC<br>AAGCUGGUGAAGGAGUACGUCGGCCAAGUGCUGAAGGGCCUGGGCAACGGCCUGGCC<br>CUGUGGCAGGCCGGCCAGUGCCUGUGGGCCCAGAGACUCGGCCACAGCCACGCCUUC<br>UGGGCCCUGGGCGAGGAACUCCUGCCCGAUAGCGGCAGAGGCCCCGACGGCGAGGUG<br>CACAAGGACAAGGACGGCGCCGUGUUCGACCUGCGCCCCUUCGUGGCCGACCUGAUC<br>GCCUUCAUGGAGGGCAGCGGCCACAGCCCCAGAUAUACCCUGUGGUUCUGCAUGGGC<br>GAGAUGUGGCCCCAGGACCAGCCCUGGGUGAAGAGACUGGUGAUGGUGAAGGUGGUG<br>CCCACCUGCCUGAAAGAGCUGCUGGAGAUGGCCAGAGAGGGCGGCGCCAGCUCCCUG<br>AAAACCGUGGACCUGCACAUUGACAACAGCCAGCCCAUCAGCCUGACCAGCGACCAG<br>UACAAGGCCUACCUGCAGGACCUGGUGGAGGACAUGGACUUCCAGGCCACCGGCAAC<br>AUC<br>(супермышиный IRF3 S396D; без эпитопной метки) |
| 212 | AUGGGCACCCCCAAGCCCAGAAUCCUGCCCUGGCUGGUGAGCCAGCUGGACCUGGGC<br>CAGCUGGAGGGAGUGGCCUGGGUGAACAAGAGCAGAACCAGAUUCAGAAUCCCCUGG<br>AAGCACGGCCUCAGACAGGACGCCCAGCAGGAGGACUUCGGCAUUUUUCAGGCUUGG<br>GCCGAGGCCACCGGCGCCUACGUGCCCGGCAGAGACAAGCCCGACCUGCCCACCUGG<br>AAAAGAAACUUCAGAAGCGCCUUGAAUAGAAAGGAGGGCCUGAGACUGGCCGAGGAC<br>AGAAGCAAGGACCCCCACGACCCUCACAAGAUCUACGAGUUCGUGAAUAGCGGCGUG |

| | |
|---|---|
| | GGCGACUUUAGCCAGCCCGACACCAGCCCCGACACCAACGGCGGCGGCAGCACCAGC<br>GACACGCAGGAGGACAUCCUGGAUGAACUGCUGGGCAACAUGGUGCUGGCCCCCCUG<br>CCCGAUCCCGGCCCCCCUUCGCUUGCCGUGGCCCCCGAGCCCUGCCCCCAGCCCCUG<br>AGAAGCCCCUCUCUGGAUAACCCCACCCCCUUCCCCCAACCUGGGCCCCAGCGAGAAU<br>CCACUGAAGAGACUUCUGGUCCCCGGCGAGGAGUGGGAGUUCGAGGUGACCGCCUUC<br>UACAGAGGCAGACAGGUGUUCCAGCAGACCAUCAGCUGCCCCGAAGGCCUGAGAUUA<br>GUGGGCAGCGAAGUGGGCGACAGGACCCUGCCCGGGUGGCCCGUGACCCUGCCCGAU<br>CCCGGCAUGAGCCUGACCGACAGAGGUGUGAUGAGCUACGUGAGACACGUGCUGAGC<br>UGCCUGGGCGGCGGCCUGGCACUGUGGAGAGCCGGCCAGUGGCUGUGGGCCCAGAGA<br>CUGGGCCACUGCCACACCUACUGGGCCGUGAGCGAGGAGCUGCUGCCCAACAGCGGC<br>CACGGCCCCGACGGCGAGGUGCCCAAGGACAAGGAAGGGGGCGUGUUCGACCUGGGC<br>CCCUUCAUCGUAGACCUGAUCACCUUUACCGAGGGCAGCGGCAGGAGCCCCAGAUAC<br>GCCCUGUGGUUCUGCGUGGGCGAAAGCUGGCCCCAGGACCAGCCCUGGACCAAGAGA<br>CUGGUGAUGGUGAAGGUAGUGCCCACCUGCCUGAGAGCCUUAGUGGAGAUGGCCAGA<br>GUGGGCGGGGCCAGCAGCCUGGAGAACACCGUGGAUCUUCACAUCGACAACAGCCAC<br>CCCCUGAGCCUGACCAGCGACCAGUACAAGGCCUACCUGCAGGACCUGGUGGAGGGC<br>AUGGACUUCCAGGGCCCCGGCGAGACC<br>(суперчеловеческий IRF3 S396D; без эпитопной метки) |
| 213 | AUGGCGCUGGCCCCCGAAAGAGCCGCCCCCAGAGUCCUCUUCGGCGAAUGGCUCCUU<br>GGCGAAAUUUCGUCGGGCUGCUACGAGGGCUUACAAUGGCUGGAUGAGGCGAGAACC<br>UGUUUCAGGGUGCCCUGGAAACACUUCGCCAGAAAGGAUCUAAGCGAAGCAGAUGCU<br>AGAAUUUUUAAGGCUUGGGCCGUGGCCAGGGGAAGAUGGCCCCCCUCGAGCAGAGGC<br>GGCGGCCCUCCCCCCCGAGGCAGAAACGGCCGAGAGAGCCGGAUGGAAAACCAAUUUC<br>AGAUGCGCCCUGAGAUCUACAAGAAGAUUCGUGAUGCUUAGAGACAACAGCGGAGAU<br>CCCGCCGAUCCCCAUAAGGUGUAUGCCCUGUCCCGGGAGCUGUGCUGGAGGGAAGGG<br>CCUGGCACUGACCAGACCGAAGCCGAAGCCCCCGCGGCCGUGCCGCCGCCCCAAGGA<br>GGCCCACCAGGCCCUUUCCUCGCUCACACCCACGCCGGUCUGCAAGCCCCGGGACCU<br>CUACCUGCCCCUGCCGGCGAUAAAGGCGACCUGUUGCUGCAGGCCGUCCAACAGAGC<br>UGCCUGGCCGAUCAUCUGCUCACAGCCAGCUGGGGCGCUGACCCCGUCCCAACAAAG<br>GCCCCCGGUGAGGGCCAAGAAGGCCUGCCUCUGACCGGCGCCUGUGCCGGCGGCCCU<br>GGCCUGCCUGCUGGCGAGCUGUACGGAUGGGCUGUCGAAACCACUCCCUCCCCCGGC<br>CCCCAACCUGCGGCCCUGACAACCGGCGAGGCAGCCGCACCCGAAAGCCCCCACCAG<br>GCCGAACCCUACCUCAGUCCCAGCCCCUCCGCCUGCACCGCUGUGCAGGAGCCCAGC<br>CCCGGUGCUCUGGACGUAACAAUCAUGUACAAAGGCAGAACCGUGCUUCAGAAGGUG<br>GUUGGACACCCCUCCUGUACUUUUCUCUACGGCCCCCCCGACCCUGCCGUGAGAGCU |

| | |
|---|---|
| | ACCGACCCGCAACAGGUGGCCUUUCCCUCGCCCGCCGAACUGCCCGAUCAAAAACAG<br>CUGAGAUACACCGAGGAGCUGCUGAGACACGUGGCGCCGGGCUUACACCUAGAGUUG<br>AGAGGCCCCCAACUCUGGGCCAGACGCAUGGGCAAGUGUAAGGUGUACUGGGAGGUC<br>GGGGGCCCUCCCGGCUCUGCCAGCCCCAGCACCCCUGCUUGUCUCUUGCCCAGAAAC<br>UGUGAUACCCCCAUCUUCGACUUCCGUGUAUUUUUCCAGGAACUGGUCGAGUUUAGA<br>GCCAGACAGAGACGAGGCAGCCCCAGAUAUACAAUCUACCUCGGCUUCGGCCAGGAC<br>CUGAGUGCCGGCAGACCUAAGGAGAAGUCGCUGGUCCUAGUGAAGUUAGAGCCCUGG<br>CUAUGUAGAGUGCACCUGGAGGGCACCCAGAGAGAAGGAGUGAGCAGCCUGGACAGC<br>AGCAGCCUGAGUCUGUGCCUGAGCUCCGCCAACUCGCUGUAUGAUGACAUCGAGUGU<br>UUCCUCAUGGAGCUGGAGCAGCCCGCC<br>(изоформа A Hu IRF7 дикого типа; P037 без эпитопной метки) |
| 214 | AUGGCCCUUGCCCCUGAGCGGGCCGCCCCCAGAGUGUUAUUCGGCGAGUGGCUGCUG<br>GGCGAGAUCAGCAGCGGCUGCUACGAGGGACUGCAGUGGCUGGACGAGGCUAGAACC<br>UGCUUCAGAGUGCCCUGGAAGCAUUUCGCCAGAAAAGACCUGAGCGAGGCUGAUGCU<br>AGAAUCUUCAAAGCCUGGGCUGUGGCCCGAGGAAGAUGGCCCCCCAGCAGCAGAGGA<br>GGCGGCCCUCCUCCCGAGGCCGAAACCGCAGAGCGUGCUGGCUGGAAAACCAACUUU<br>AGGUGUGCCCUGAGGAGCACCAGAAGAUUCGUUAUGCUCAGAGACAACAGCGGGGAC<br>CCCGCCGACCCGCACAAGGUGUACGCCUUAAGUAGGGAGCUGUGCUGGAGAGAGGGA<br>CCGGGGACCGACCAAACCGAGGCUGAGGCGCCCGCCGCCGUUCCACCUCCCCAGGGU<br>GGUCCCCCAGGGCCCUUUCUGGCACACACCCACGCCGGAUUACAGGCGCCAGGGCCC<br>UUACCCGCCCCCGCCGGAGACAAAGGCGACCUCCUGCUGCAAGCCGUGCAACAAAGC<br>UGCCUGGCCGAUCACUUACUAACCGCUAGCUGGGGCGCCGAUCCUGUUCCCACCAAG<br>GCCCCCGGUGAAGGGCAAGAAGGACUGCCCUUAACCGGCGCCUGUGCCGGAGGCCCU<br>GGUCUGCCAGCCGGCGAGCUGUACGGUUGGGCUGUCGAAACAACACCCAGUCCGGGC<br>CCACAGCCUGCCGCUCUGACCACCGGCGAAGCCGCCGCCCCCGAGAGCCCACACCAG<br>GCUGAACCCUACCUGAGCCCCAGCCCCAGCGCCUGCACCGCUGUGCAGGAGCCUAGC<br>CCCGGCGCUCUUGAUGUGACAAUAAUGUACAAGGGCAGGACCGUGCUGCAAAAGGUC<br>GUGGGCCAUCCGUCGUGUACCUUUCUGUACGGCCCUCCAGACCCCGCGGUUAGAGCC<br>ACCGACCCCCAGCAAGUCGCCUUCCCCUCCCCCGCCGAACUGCCCGACCAAAAGCAG<br>CUGCGGUACACAGAAGAACUACUUAGACACGUGGCCCCCGGUCUGCACUUGGAGCUG<br>AGAGGCCCCCAGCUCUGGGCCAGAAGAAUGGGCAAGUGCAAAGUGUACUGGGAGGUG<br>GGCGGCCCACCCGGCUCAGCUUCGCCCUCCACACCCGCAUGCCUGCUGCCCAGAAAU<br>UGCGACACGCCCAUCUUCGAUUUUAGAGUGUUCUUUCAGGAGUUGGUGGAGUUCAGA<br>GCCAGACAAAGACGCGGCAGCCCCAGAUACACCAUUUACCUCGGCUUCGGCCAGGAC |

| | |
|---|---|
| | CUCAGCGCUGGCAGACCCAAGGAGAAGAGUCUGGUCCUCGUGAAGCUGGAGCCCUGG<br>CUGUGCAGAGUGCACCUGGAGGGCACCCAGCGUGAAGGCGUGAGCAGCCUGGAUUCA<br>AGCGACCUGGACCUAUGCCUAAGCAGCGCUAACUCACUGUACGACGAUAUCGAAUGC<br>UUCCUGAUGGAACUGGAGCAGCCUGCC<br>(конститутивно активный Hu IRF7 S477D/S479D; P033 без эпитопной метки) |
| 215 | AUGGCCCUGGCACCCGAGAGGGCCGCCCCCAGGGUGCUCUUCGGCGAGUGGUUACUA<br>GGCGAAAUUAGCAGCGGCUGCUAUGAAGGCCUUCAGUGGCUGGACGAGGCCAGAACC<br>UGCUUUAGAGUUCCCUGGAAGCACUUCGCCCGGAAAGAUCUCUCUGAAGCCGACGCC<br>AGAAUAUUCAAGGCCUGGGCUGUCGCCAGGGGCAGGUGGCCACCCUCCAGCCGAGGU<br>GGCGGCCCUCCCCCCUGAGGCUGAGACUGCGGAAAGGGCGGGCUGGAAGACCAAUUUC<br>AGAUGCGCUCUGAGAAGCACCAGACGUUUUGUGAUGCUAAGAGACAAUAGCGGCGAU<br>CCCGCCGACCCCCAUAAGGUAUACGCACUGAGCCGAGAGCUCUGUUGGAGAGAAGGC<br>CCCGGCACCGACCAGACCGAGGCUGAAGCCCCUGCAGCCGUGCCCCCCCCUCAAGGC<br>GGGCCCCCCGGCCCCUUCCUGGCCCAUACCCAUGCAGGGUUACAAGCACCCGGGCCC<br>UUGCCCGCCCCAGCGGGAGACAAGGGCGACCUCUUACUGCAGGCCGUGCAACAAAGU<br>UGUCUGGCGGACCACCUGCUGACCGCAUCAUGGGGCGCGGAUCCUGUGCCCACCAAG<br>GCACCCGGCGAAGGCCAGGAGGGCCUGCCCUUGACCGGCGCCUGCGCUGGCGGACCC<br>GGCCUACCUGCUGGCGAACUGUAUGGCUGGGCCGUAGAGACGACUCCCAGCCCUGGC<br>CCACAACCCGCGGCUUUGACCACCGGCGAAGCCGCCGCCCCCGAGUCUCCGCACCAG<br>GCCGAGCCUUACCUCAGCCCAAGCCCUAGCGCCUGCACCGCCGUGCAAGAACCUAGC<br>CCCGGAGCCCUGGAUGUGACAAUCAUGUACAAGGGUAGAACCGUACUGCAAAAGGUG<br>GUGGGUCAUCCCAGCUGCACCUUUCUUUACGGCCCACCCGACCCUGCCGUGCGAGCC<br>ACAGACCCACAACAGGUCGCCUUCCCAAGCCCCGCCGAACUGCCCGAUCAGAAACAG<br>CUGAGAUAUACAGAGGAGCUUCUGCGGCACGUAGCUCCCGGCCUACAUCUCGAGCUG<br>AGGGGCCCACAACUGUGGGCCAGACGCAUGGGCAAAUGCAAGGUCUACUGGGAAGUG<br>GGAGGCCCCCCCGGCAGCGCAUCUCCCAGCACGCCCGCGUGCCUGCUGCCUAGAAAU<br>UGCGACACCCCCAUCUUUGACUUCCGGGUAUUCUUUCAGGAGCUGGUAGAGUUCAGA<br>GCCAGGCAGCGGAGGGGCUCCCCCAGAUACACAAUCUACCUGGGCUUCGGACAGGAC<br>CUGUCCGCCGGCCGCCCCAAGGAAAAGAGCCUGGUGCUGGUGAAGCUGGAGCCCUGG<br>CUGUGUAGGGUACACCUCGAAGGCACCCAGAGAGAAGGAGUGAGCUCGCUUGAUGAC<br>AGCGAUCUGUCGGAUUGCCUUAGCAGCGCCAACAGCCUGUAUGAUGAUAUCGAGUGC<br>UUCCUUAUGGAACUGGAGCAGCCCGCC<br>(конститутивно активный Hu IRF7 S475D/S477D/L480D; P034 без эпитопной метки) |

| | |
|---|---|
| 216 | AUGGCCCUAGCCCCCGAAAGAGCAGCUCCCAGAGUGCUGUUCGGCGAAUGGCUGCUU<br>GGCGAGAUCAGCAGCGGCUGCUACGAAGGCCUGCAGUGGCUGGACGAAGCCCGCACC<br>UGUUUCAGAGUGCCCUGGAAGCACUUCGCUAGAAAGGAUUUGAGCGAGGCUGAUGCU<br>AGAAUCUUUAAGGCUUGGGCUGUGGCAAGAGGCAGAUGGCCGCCUAGUAGCAGAGGG<br>GGCGGACCUCCCCCCGAGGCUGAGACCGCUGAGAGAGCAGGGUGGAAAACCAACUUC<br>AGAUGCGCGCUGAGAAGCACCCGAAGAUUCGUGAUGCUACGUGACAAUAGCGGCGAC<br>CCCGCCGACCCCCACAAAGUGUACGCCCUGUCCCGAGAACUUUGCUGGAGAGAGGGA<br>CCCGGCACCGAUCAAACAGAGGCUGAGGCCCCGGCCGCUGUACCCCCGCCCCAAGGA<br>GGCCCCCCAGGCCCCUUUCUGGCUCAUACACAUGCCGGCCUGCAGGCACCCGGGCCC<br>CUCCCGGCUCCUGCCGGCGACAAGGGCGAUCUCCUUCUCCAGGCCGUGCAGCAGAGC<br>UGCCUGGCCGAUCACCUGCUGACCGCCUCGUGGGGCGCCGACCCCGUGCCCACCAAA<br>GCCCCGGGUGAAGGCCAAGAGGGGCUCCCUUUAACCGGAGCAUGCGCCGGAGGCCCC<br>GGCCUGCCAGCCGGCGAGUUAUAUGGCUGGGCUGUGGAGACCACACCCUCCCCCGGC<br>CCUCAACCCGCUGCCCUGACCACCGGUGAGGCCGCCGCCCCCGAGAGCCCACACCAG<br>GCCGAACCCUACCUGAGCCCUAGCCCUAGCGCCUGCACCGCCGUGCAAGAACCCAGC<br>CCCGGAGCCCUGGAUGUGACCAUUAUGUACAAGGGCCGGACAGUGCUGCAAAAGGUU<br>GUGGGACACCCGAGCUGCACCUUUCUGUACGGUCCGCCUGACCCCGCCGUGAGAGCC<br>ACGGACCCGCAGCAGGUGGCCUUCCCCUCACCCGCGGAGCUGCCCGACCAAAAGCAA<br>CUCAGAUACACAGAAGAACUAUUGCGUCACGUCGCGCCCGGCCUGCAUCUGGAGCUG<br>AGAGGCCCCCAGCUCUGGGCCAGAAGGAUGGGCAAAUGCAAGGUGUACUGGGAGGUG<br>GGAGGCCCCCCCGGCAGCGCCAGCCCCAGCACUCCCGCGUGCCUGCUGCCCAGAAAU<br>UGCGACACUCCCAUCUUCGAUUUCAGGGUGUUCUUCCAGGAGCUGGUGGAGUUCAGA<br>GCCAGGCAGAGAAGGGGUAGCCCCAGAUACACAAUCUAUCUAGGCUUUGGACAAGAU<br>CUGAGCGCCGGCCGGCCUAAGGAAAAAAGCCUGGUGCUGGUAAAGCUGGAGCCGUGG<br>CUUUGUAGAGUGCACCUGGAGGGGACGCAGCGAGAGGGCGUGAGCAGCUUAGACGAC<br>GAUGACUUGGAUCUGUGUCUCGACAGCGCCAACGACUUGUACGACGACAUCGAGUGC<br>UUCCUGAUGGAACUGGAGCAGCCCGCC<br>(конститутивно активный Hu IRF7 S475D/S476D/S477D/S479D/S483D/S487D; P035 без эпитопной метки) |
| 217 | AUGGCCCUGGCCCCCGAGAGAGCCGCCCCCAGAGUGCUCUUCGGCGAGUGGCUGCUG<br>GGCGAGAUAAGCAGCGGCUGCUACGAAGGUCUGCAGUGGCUAGACGAGGCCAGAACC<br>UGCUUUAGAGUGCCCUGGAAGCACUUCGCUCGAAAGGACCUGUCCGAGGCCGAUGCU<br>AGAAUUUUUAAGGCUUGGGCCGUCGCUAGGGGAAGAUGGCCCCCUAGCAGUAGAGGC<br>GGCGGCCCCCCUCCCGAAGCCGAGACGGCCGAGAGGGCCGGCUGGAAAACCAAUUUC |

| | |
|---|---|
| | AGAUGCGCCCUGAGGAGCACCCGCAGGUUCGUAAUGCUGCGAGACAAUAGCGGCGAU<br>CCUGCGGAUCCUCACAAGGUUUACGCCUUGAGUAGAGAACUGUGCUGGCGGGAGGGC<br>CCCGGAACCGACCAGACGGAGGCAGAGGCACCCGCUGCCGUGCCCCCCCCUCAAGGA<br>GGACCCCCUGGACCCUUUCUGGCCCACACCCACGCUGGUCUGCAGGCCCCAGGCCCA<br>CUGCCCGCCCCAGCGGGCGAUAAGGGUGACCUGCUCCUACAGGCGGUGCAACAGAGC<br>UGUCUGGCCGACCACCUGUUGACCGCCAGCUGGGGGGCCGACCCGGUGCCCACCAAA<br>GCUCCCGGAGAGGGCCAAGAAGGCCUCCCACUAACUGGCGCCUGCGCCGGGGGCCCG<br>GGAUUACCCGCCGGCGAGCUGUAUGGCUGGGCCGUGGAGACCACGCCCAGCCCCGAG<br>GGCGUGUCGUCCCUGGACAGCAGCAGCCUGAGCCUGUGCCUGAGCUCCGCCAACAGC<br>CUGUAUGACGACAUCGAGUGCUUCCUGAUGGAGCUGGAACAACCCGCC<br>(конститутивно активный усеченный Hu IRF7 1-246+468-503; P032 без эпитопной метки) |
| 218 | AUGGCACUGGCGCCUGAAAGAGCCGCUCCGCGUGUGCUCUUCGGCGAGUGGCUGCUG<br>GGCGAGAUCAGCUCCGGCUGCUACGAGGGUCUACAGUGGCUGGACGAGGCCAGAACC<br>UGUUUUAGAGUGCCCUGGAAGCACUUCGCGAGAAAGGACCUGAGCGAGGCCGACGCC<br>AGAAUCUUCAAAGCCUGGGCAGUGGCUAGGGGCAGAUGGCCUCCCAGCAGCCGGGGC<br>GGCGGCCCACCCCCCGAGGCCGAAACCGCCGAAAGAGCUGGCUGGAAGACCAACUUC<br>AGAUGCGCCCUGAGAAGCACCAGAAGAUUUGUCAUGCUGAGAGAUAAUUCAGGAGAC<br>CCCGCCGACCCUCACAAGGUGUACGCCCUGUCCAGAGAGCUGUGUUGGAGAGAGGGC<br>CCCGGAACCGACCAGACCGAGGCCGAGGCUCCAGCUGCCGUGCCACCCCCCCAAGGC<br>GGACCACCCGGCCCCUUCUUGGCACAUACGCACGCCGGCCUCCAGGCUCCCGGCCCU<br>CUGCCCGCCCCUGCUGGUGACAAAGGCGAUCUGCUGCUGCAAGCCGUCCAGCAAUCC<br>UGCUUGGCUGACCACCUGCUGACCGCUAGCUGGGGAGCCGACCCCGUUCCCACCAAG<br>GCUCCCGGAGAAGGACAGGAGGGCCUGCCCCUUACCGGCGCUUGCGCGGGGGGCCCU<br>GGCUUGCCUGCCGGCGAACUGUACGGCUGGGCCGUGGAGACCACGCCUUCCCCCGAG<br>GGCGUGUCCAGCCUGGACGAUGAUGACCUGGAUCUGUGCCUGGACAGCGCCAACGAC<br>CUGUACGAUGACAUCGAGUGCUUUUUGAUGGAGCUGGAGCAGCCCGCC<br>(конститутивно активный усеченный Hu IRF7 1-246+468-503 плюс S475D/S476D/S477D/S479D/S483D/S487D; P036 без эпитопной метки) |
| 219 | AUGGCCCUGGCCCCCGAGAGAGCCGCGCCCAGAGUGCUGUUCGGCGAAUGGCUGCUG<br>GGCGAGAUCAGCAGCGGCUGCUAUGAGGGCCUGCAGUGGCUCGACGAAGCCAGGACG<br>UGCUUCAGAGUCCCCUGGAAGCACUUCGCCAGAAAGGAUCUGAGCGAGGCUGACGCC<br>AGAAUCUUCAAGGCCUGGGCAGUUGCGCGUGGGAGAUGGCCCCCCAGCUCGCGGGGC<br>GGCGGUCCCCCCCCCUGAGGCCGAGACCGCCGAAAGAGCCGGAUGGAAAACCAACUUU |

| | |
|---|---|
| | CGAUGCGCCCUCAGAAGCACCAGACGGUUUGUGAUGCUGAGAGAUAACAGCGGCGAC<br>CCUGCAGACCCCCAUAAAGUGUAUGCCCUGAGCAGAGAGCUGUGUUGGCGAGAGGGC<br>CCCGGAACCGACCAAACCGAGGCCGAGGCCCCCGCCGCCGUACCCCCCCCUCAAGGC<br>CCCCAGCCUGCUGCUCUGACCACGGGAGAAGCCGCCGCUCCUGAGAGCCCCCACCAA<br>GCCGAGCCCUAUCUGAGCCCUAGCCCCAGCGCCUGCACCGCCGUGCAGGAGCCCUCA<br>CCGGGCGCCCUAGACGUGACCAUCAUGUACAAGGGGCGCACGGUGCUGCAAAAGGUG<br>GUGGGCCACCCCAGCUGCACCUUCCUGUACGGCCCCCCCGACCCUGCCGUGAGAGCC<br>ACCGACCCCCAGCAAGUCGCCUUCCCCAGCCCCGCCGAGCUGCCCGACCAGAAGCAG<br>CUGAGGUACACCGAGGAGUUGCUGAGACAUGUGGCCCCCGGCUUGCACCUCGAGCUG<br>AGAGGCCCGCAGCUCUGGGCCAGAAGAAUGGGCAAGUGCAAGGUGUACUGGGAGGUG<br>GGCGGCCCCCCCGGCAGCGCGAGCCCAAGCACCCCGGCCUGCCUGCUGCCUAGAAAC<br>UGCGACACCCCUAUCUUCGACUUCAGAGUAUUUUUCCAGGAGCUGGUCGAGUUCAGG<br>GCCAGACAGCGUAGAGGCAGCCCCAGAUACACCAUCUACCUUGGAUUCGGCCAGGAC<br>CUGAGCGCCGGCAGACCCAAAGAGAAGUCCCUGGUACUGGUGAAGCUAGAGCCCUGG<br>CUGUGUAGGGUGCAUCUGGAAGGCACCCAAAGAGAGGGCGUAAGCUCGCUUGACAGC<br>AGCAGCCUCAGCCUGUGCCUGAGCAGCGCUAACAGCUUAUACGACGACAUCGAGUGC<br>UUCCUGAUGGAGCUGGAACAACCCGCC<br>(усеченный Hu IRF7 1-151+247-503; P038 без эпитопной метки; нулевая мутация) |
| 220 | AUGGGCGGCCCUCCCGGGCCUUUCCUGGCCCAUACACACGCCGGCCUACAGGCUCCU<br>GGCCCUCUGCCCGCCCCGGCCGGCGACAAGGGCGACCUCCUGCUGCAGGCCGUGCAG<br>CAGUCCUGUCUGGCCGACCACCUGCUGACUGCUAGCUGGGGCGCCGAUCCCGUGCCC<br>ACCAAGGCCCCAGGAGAGGGGCAAGAGGGCCUGCCUCUAACCGGCGCAUGCGCAGGU<br>GGACCAGGCCUCCCCGCCGGCGAGCUGUAUGGUUGGGCCGUGGAGACAACCCCCAGC<br>CCCGGCCCGCAGCCUGCUGCGCUGACCACAGGCGAGGCCGCUGCCCCUGAGAGCCCC<br>CACCAAGCUGAACCCUACCUGAGCCCCAGCCCCUCUGCCUGCACAGCGGUGCAGGAG<br>CCCAGUCCCGGCGCCUUGGACGUGACCAUCAUGUAUAAGGGCAGGACUGUGUUACAA<br>AAGGUAGUGGGCCACCCAAGUUGUACCUUUCUGUACGGGCCCCCCGACCCAGCCGUG<br>CGCGCCACCGACCCCCAGCAGGUGGCCUUCCCCAGCCCCGCUGAGUUGCCCGAUCAG<br>AAACAACUCCGGUACACCGAGGAAUUACUUAGACAUGUGGCUCCCGGCCUGCAUCUG<br>GAGCUUAGAGGUCCACAGUUGUGGGCCAGAAGAAUGGGCAAGUGCAAGGUUUAUUGG<br>GAGGUCGGAGGCCCCCCGGGCAGCGCCAGCCCCAGCACCCCCGCCUGUCUUCUGCCC<br>AGAAACUGCGACACCCCAAUCUUCGAUUUCAGAGUGUUUUUCCAGGAACUGGUGGAG<br>UUCAGAGCAAGGCAAAGAAGAGGCAGCCCUAGAUACACCAUCUACCUGGGCUUUGGC<br>CAAGACCUGAGCGCCGGCAGACCCAAGGAAAAAUCCCUGGUCCUGGUGAAACUGGAG |

| | |
|---|---|
| | CCCUGGCUGUGCAGAGUCCACCUGGAGGGCACCCAGAGAGAGGGCGUGAGCAGCCUG<br>GACUCGAGCAGCCUGUCCCUGUGUCUGAGCAGCGCGAAUUCGCUAUAUGACGACAUC<br>GAAUGCUUUCUGAUGGAGCUGGAACAGCCCGCC<br>(усеченный Hu IRF7 152-503; P039 без эпитопной метки; нулевая мутация) |
| 221 | AUGCCUCACAGCAGCCUCCACCCUAGCAUCCCUUGCCCUAGAGGCCACGGCGCCCAG<br>AAGGCCGCCCUCGUGCUUUUAAGCGCCUGCUUGGUGACCCUUUGGGGCUUGGGCGAG<br>CCUCCAGAGCACACCUUGAGAUAUUUGGUGCUCCACCUGGCCAGCCUUCAGCUGGGC<br>UUGUUACUCAACGGCGUGUGCAGCCUGGCCGAGGAGCUGAGACACAUCCACAGCAGA<br>UACAGAGGCAGCUACUGGAGAACCGUGAGAGCGUGUCUGGGCUGCCCUCUGAGAAGA<br>GGCGCCUUGCUUCUUCUCAGUAUCUACUUCUACUACUCCCUGCCUAACGCCGUGGGC<br>CCUCCUUUCACCUGGAUGCUGGCACUGCUCGGCCUCAGCCAGGCCCUGAACAUCUUG<br>UUGGGCUUGAAGGGCCUGGCCCCUGCCGAGAUCAGCGCCGUGUGCGAGAAGGGCAAC<br>UUCAACAUGGCCCACGGAUUGGCUUGGAGCUACUACAUCGGCUACCUGAGACUGAUC<br>CUGCCUGAGCUGCAGGCCAGAAUCAGAACCUACAACCAGCACUACAACAACCUGCUG<br>CGCGGCGCAGUGAGCCAGAGACUGUAUAUUCUGCUGCCUCUGGACUGCGGCGUGCCU<br>GACAACCUGAGCAUGGCCGACCCUAACAUCAGAUUCCUGGACAAGCUGCCUCAGCAG<br>ACCGGCGACCACGCCGGCAUCAAGGACAGAGUGUACAGCAACAGCAUCUAUGAGCUG<br>CUCGAGAAUGGCCAGAGAGCCGGCACCUGCGUGCUGGAGUACGCCACCCCUCUGCAG<br>ACCCUGUUCGCCAUGAGCCAGUAUAGUCAAGCUGGCUUCAGCAGAGAGGACAGACUG<br>GAGCAGGCCAAGCUGUUCUGCAGAACCCUGGAGGACAUUCUGGCUGACGCCCCUGAG<br>AGCCAGAACAACUGCCGACUGAUCGCCUACCAGGAACCAGCCGACGACAGCAGCUUC<br>AGUCUUUCUCAGGAGGUUCUUCGCCACUUGCGCCAGGAGGAGAAGGAGGAGGUGACC<br>GUGGGCAGCCUGAAGACCUCCGCAGUCCCUAGCACCAGCACCAUGAGUCAGGAGCCG<br>GAGCUAUUAAUCAGCGGCAUGGAGAAGCCUCUUCCACUCCGAACCGACUUCAGCGCC<br>ACCAACUUCAGCCUGCUGAAGCAGGCAGGUGACGUUGAGGAGAAUCCGGGACCUAUG<br>ACCGAGUACAAGCUGGUGGUUGUGGGCGCCGACGGCGUGGGCAAGAGCGCCCUGACC<br>AUCCAGCUGAUCCAG<br>(KRAS(G12D)25mer_nt.STING(V155M)) |
| 222 | AUGACCGAGUACAAGCUAGUAGUCGUGGGCGCCGACGGCGUGGGCAAGAGCGCCCUC<br>ACCAUCCAGCUAAUCCAGGCCACCAACUUCAGCUUGCUCAAGCAGGCCGGCGACGUG<br>GAGGAGAACCCAGGCCCUAUGCCUCACAGCAGCCUUCACCCUAGCAUCCCUUGCCCU<br>AGAGGCCACGGCGCCCAGAAGGCCGCCCUGGUGCUGCUGAGCGCCUGCCUGGUGACC<br>CUGUGGGGCCUGGGCGAGCCUCCUGAGCACACCCUGAGAUAUCUGGUGCUUCACCUG<br>GCCAGUUUACAGCUGGGCCUGCUUCUUAACGGCGUGUGCAGCCUGGCCGAGGAGCUG |

| | |
|---|---|
| | AGACACAUCCACAGCAGAUACAGAGGCAGCUACUGGAGAACCGUGAGAGCCUGCCUA<br>GGCUGCCCUCUGAGAAGAGGCGCUCUGUUGCUACUUUCCAUCUACUUCUACUACUCC<br>CUGCCUAACGCCGUGGGCCCUCCUUUCACUUGGAUGCUGGCGUUGCUGGGUCUGAGC<br>CAGGCCCUGAACAUCCUUCUCGGUCUGAAGGGCCUGGCCCCUGCCGAGAUCAGCGCC<br>GUGUGCGAGAAGGGCAACUUCAACAUGGCCCACGGACUCGCCUGGAGCUACUACAUC<br>GGCUACCUGAGACUGAUCCUGCCUGAGCUGCAGGCCAGAAUCAGAACCUACAACCAG<br>CACUACAACAACCUGCUGCGGGGCGCCGUGAGCCAGAGACUGUAUAUACUUCUUCCU<br>CUGGACUGCGGCGUGCCUGACAACCUGAGCAUGGCCGACCCUAACAUCAGAUUCCUG<br>GACAAGCUGCCUCAGCAGACCGGCGACCACGCCGGCAUCAAGGACAGAGUGUACAGC<br>AACUCCAUUUAUGAGCUGCUCGAGAAUGGCCAGAGAGCCGGCACCUGCGUGCUGGAG<br>UACGCCACCCCUCUGCAGACCCUGUUCGCCAUGAGCCAGUACAGUCAGGCUGGAUUC<br>AGCAGAGAGGACAGACUGGAGCAGGCCAAGCUGUUCUGCAGGACACUGGAGGACAUA<br>CUAGCAGACGCCCCUGAGAGCCAGAACAACUGCAGACUGAUUGCCUACCAGGAGCCU<br>GCGGACGACAGCUCCUUCAGUCUGAGUCAGGAGGUGUUGCGGCACUUACGCCAAGAA<br>GAGAAGGAGGAGGUGACCGUGGGCAGCCUGAAGACUAGCGCUGUGCCUAGCACCAGC<br>ACAAUGUCACAGGAGCCGGAAUUGCUAAUCAGCGGCAUGGAGAAGCCUCUCCCAUUA<br>CGUACCGACUUCAGC<br>(KRAS(G12D)25mer_ct.STING(V155M)) |
| 223 | AUGCCUCACAGCAGCCUUCACCCUAGCAUCCCUUGCCCUAGAGGCCACGGCGCCCAG<br>AAGGCCGCCCUAGUGCUCCUUAGCGCCUGCCUCGUGACCCUAUGGGGCUUAGGCGAG<br>CCUCCAGAGCACACCUUGAGAUACCUCGUCCUCCACCUGGCUAGUCUACAGCUGGGC<br>CUUCUCCUCAACGGCGUGUGCAGCCUGGCCGAGGAGCUGAGACACAUCCACAGCAGA<br>UACAGAGGCAGCUACUGGAGAACCGUGAGAGCGUGCCUGGGCUGCCCUCUGAGAAGA<br>GGCGCACUGCUGUUACUCAGCAUCUACUUCUACUACUCACUGCCAAACGCCGUGGGC<br>CCUCCUUUCACCUGGAUGCUGGCCUUGCUCGGAUUGAGCCAGGCCCUGAACAUUUUA<br>CUGGGAUUGAAGGGCCUGGCCCCUGCCGAGAUCAGCGCCGUGUGCGAGAAGGGCAAC<br>UUCAACAUGGCCCACGGCCUAGCUUGGAGCUACUACAUCGGCUACCUGAGACUGAUC<br>CUGCCUGAGCUGCAGGCCAGAAUCAGAACCUACAACCAGCACUACAACAACCUGCUG<br>CGUGGAGCGGUGAGCCAGAGACUGUAUAUCCUCCUGCCUCUGGACUGCGGAGUGCCU<br>GACAACCUGAGCAUGGCCGACCCUAACAUCAGAUUCCUGGACAAGCUGCCUCAGCAG<br>ACCGGCGACCACGCCGGCAUCAAGGACAGAGUGUACAGCAACUCAAUCUACGAGCUG<br>UUGGAGAAUGGCCAGAGAGCCGGCACCUGCGUGCUGGAGUACGCCACCCCUCUGCAG<br>ACCCUGUUCGCCAUGAGCCAGUACUCUCAGGCAGGCUUCAGCAGAGAGGACAGACUG<br>GAGCAGGCCAAGCUGUUCUGCAGAACCCUGGAGGACAUCCUGGCGGACGCCCCUGAG<br>AGCCAGAACAACUGCCGGCUUAUCGCCUACCAGGAGCCAGCAGACGACAGCAGCUUC |

| | |
|---|---|
| | UCUCUCUCACAAGAGGUACUGCGCCAUCUUCGCCAGGAGGAGAAGGAGGAGGUGACC<br>GUGGGCAGCCUGAAGACAUCCGCCGUACCUAGCACCAGCACCAUGUCUCAGGAACCG<br>GAACUGUUGAUCAGCGGCAUGGAGAAGCCUCUGCCACUGCGCACCGACUUCAGCGCC<br>ACCAACUUCUCCCUACUGAAGCAAGCCGGUGACGUUGAAGAGAACCCUGGCCCUAUG<br>ACCGAGUACAAGCUGGUAGUAGUAGGCGCCGACGGCGUGGGCAAGAGCGCCCUGACC<br>AUCCAGCUGAUCCAGAUGACUGAAUAUAAGCUUGUCGUCGUGGGCGCAGAUGGCGUU<br>GGUAAGAGCGCACUUACAAUUCAACUCAUUCAGAUGACGGAGUAUAAGCUGGUGGUG<br>GUCGGAGCUGACGGCGUAGGCAAGAGUGCCCUUACUAUUCAGCUAAUUCAG<br>(KRAS(G12D)25mer^3_nt.STING(V155M)) |
| 224 | AUGACCGAGUACAAGCUUGUGGUGGUUGGCGCCGACGGCGUGGGCAAGAGCGCCUUA<br>ACCAUCCAGCUUAUCCAGAUGACAGAGUAUAAGCUAGUGGUGGUCGGCGCAGACGGA<br>GUGGGAAAGAGUGCAUUAACUAUUCAACUCAUCCAAAUGACCGAAUACAAGCUAGUA<br>GUUGUGGGUGCAGAUGGCGUCGGCAAGUCUGCACUGACAAUUCAGCUCAUCCAGGCC<br>ACCAACUUCAGCCUGCUGAAGCAGGCCGGCGACGUGGAGGAGAACCCUGGCCCUAUG<br>CCUCACAGCAGCCUGCACCCUAGCAUCCCUUGCCCUAGAGGCCACGGCGCCCAGAAG<br>GCCGCCCUGGUGCUGCUGAGCGCCUGCCUGGUGACCCUGUGGGGCCUGGGCGAGCCU<br>CCUGAGCACACCCUGAGAUACCUAGUUUUGCACCUGGCUUCUCUGCAGCUGGGCCUA<br>CUGCUCAACGGCGUGUGCAGCCUGGCCGAGGAGCUGAGACACAUCCACAGCAGAUAC<br>AGAGGCAGCUACUGGAGAACCGUGAGAGCAUGCUUAGGCUGCCCUCUGAGAAGAGGC<br>GCUCUGCUCCUCUUGUCCAUCUACUUCUACUACUCGCUACCUAACGCCGUGGGCCCU<br>CCUUUCACCUGGAUGCUGGCCCUCUUGGGAUUAAGCCAGGCCCUGAACAUCUUGCUG<br>GGACUGAAGGGCCUGGCCCCUGCCGAGAUCAGCGCCGUGUGCGAGAAGGGCAACUUC<br>AACAUGGCCCACGGACUCGCUUGGAGCUACUACAUCGGCUACCUGAGACUGAUCCUG<br>CCUGAGCUGCAGGCCAGAAUCAGAACCUACAACCAGCACUACAACAACCUGCUGCGG<br>GGAGCAGUGAGCCAGAGACUGUAUAUUCUGCUCCCUCUGGACUGCGGCGUGCCUGAC<br>AACCUGAGCAUGGCCGACCCUAACAUCAGAUUCCUGGACAAGCUGCCUCAGCAGACC<br>GGCGACCACGCCGGCAUCAAGGACAGAGUGUACAGCAACAGCAUUUACGAGCUGCUG<br>GAGAACGGCCAGAGAGCCGGCACCUGCGUGCUGGAGUACGCCACCCCUCUGCAGACC<br>CUGUUCGCCAUGAGCCAGUACUCCCAGGCAGGAUUCAGCAGAGAGGACAGACUGGAG<br>CAGGCCAAGCUGUUCUGCCGUACUCUUGAGGACAUCCUUGCAGACGCCCCUGAGAGC<br>CAGAACAACUGCCGGUUGAUUGCCUACCAGGAACCGGCAGACGACAGCUCAUUCUCC<br>UUGUCUCAGGAGGUCCUUAGACACCUGCGGCAGGAGGAGAAGGAGGAGGUGACCGUG<br>GGCAGCCUGAAGACAUCCGCCGUGCCUAGCACGUCUACCAUGUCCCAGGAGCCGGAA<br>CUGCUAAUCAGCGGCAUGGAGAAGCCUCUGCCUCUCAGGACCGACUUCAGC<br>(KRAS(G12D)25mer^3_ct.STING(V155M)) |

| | |
|---|---|
| 225 | AUGCCCCAUAGCAGCCUGCACCCCAGCAUCCCCUGCCCCAGAGGCCACGGCGCCCAG<br>AAGGCCGCCCUGGUCCUGCUGAGCGCAUGCCUGGUCACCCUGUGGGGCCUGGGCGAG<br>CCCCCCGAGCACACCCUGAGAUACCUGGUGCUGCACCUCGCCAGCCUGCAGCUGGGC<br>CUGCUGCUGAACGGCGUGUGCAGCCUGGCCGAGGAGCUGAGACACAUCCACAGCAGA<br>UAUAGAGGCAGCUACUGGAGAACCGUGAGAGCUUGCCUCGGCUGCCCCCUGAGAAGA<br>GGCGCCCUGCUGCUGCUGAGCAUCUACUUUUACUACAGCCUGCCCAACGCUGUGGGC<br>CCCCCUUUCACGUGGAUGCUCGCCCUGCUGGGACUGAGCCAGGCCCUGAACAUCCUG<br>CUGGGCCUUAAGGGCCUAGCCCCCGCCGAGAUCAGCGCCGUGUGCGAGAAGGGCAAC<br>UUCAAUGUGGCCCACGGCCUGGCCUGGAGCUACUACAUCGGCUACCUGAGACUGAUC<br>CUGCCCGAGCUGCAGGCCAGAAUCAGAACCUACAAUCAGCACUACAACAACCUGCUG<br>AGAGGCGCCGUGAGCCAGAGACUGUACAUCCUGCUGCCCCUGGACUGCGGCGUGCCC<br>GACAACCUCAGCAUGGCCGACCCCAACAUCAGAUUCCUGGACAAGCUGCCCCAGCAG<br>ACCGGCGACCACGCCGGCAUCAAGGAUCGCGUGUACAGCAACAGCAUCUACGAGCUG<br>CUGGAAAACGGCCAGAGAGCCGGAACCUGCGUGCUGGAGUACGCCACACCCCUGCAG<br>ACCCUGUUCGCCAUGAGCCAGUACAGCCAGGCCGGCUUCAGCAGAGAGGACAAGCUG<br>GAGCAGGCCAAGCUGUUCUGCAGAACCCUGGAGGAUAUCCUCGCCGACGCCCCCGAG<br>AGCCAGAACAACUGCAGGCUGAUCGCGUACCAGGAGCCCGCUGACGACAGCAGCUUU<br>AGCCUGAGCCAGGAGGUGCUGAGACAUCUGCGUCAAGAGGAAAAGGAGGAGGUGACC<br>GUGGGCUCCCUGAAGACCAGCGCCGUGCCCAGCACCAGCACCAUGAGCCAGGAGCCC<br>GAGCUGCUGAUCAGCGGCAUGGAGAAGCCACUGCCCCUCAGAACCGACUUCAGCACC<br>(Hu STING (R284K) var; без эпитопной метки) |
| 226 | ATIGTAMYK (пептид BRLF1 EBV) |
| 227 | SIIPSGPLK (пептид FLU) |
| 228 | AVDLSHFLK (пептид NEF HIV) |
| 229 | AVFDRKSDAK (пептид EBV) |
| 230 | YVNVNMGLK (пептид корового антигена HBV) |
| 231 | RVCEKMALY (пептид HC) |
| 232 | KLGGALQAK (пептид CMV) |

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция, содержащая:

одну или более мРНК, каждая из которых содержит открытую рамку считывания, кодирующую пептид с активирующей онкогенной мутацией, и необязательно содержащая

одну или более мРНК, каждая из которых содержит открытую рамку считывания, кодирующую полипептид, который усиливает иммунный ответ на пептид с активирующей онкогенной мутацией у субъекта, причем иммунный ответ включает клеточный или гуморальный иммунный ответ, характеризующийся:

(i) стимуляцией сигнального пути интерферона I типа,

(ii) стимуляцией сигнального пути NFκB,

(iii) стимуляцией воспалительного ответа,

(iv) стимуляцией продукции цитокинов,

(v) стимуляцией развития, активности или мобилизации дендритных клеток, и

(vi) комбинацией любого из (i)-(v); и

фармацевтически приемлемый носитель.

2. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 1, содержащая одну или более мРНК, каждая из которых содержит открытую рамку считывания, кодирующую полипептид, который усиливает у субъекта иммунный ответ на пептид с активирующей онкогенной мутацией.

3. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из пп. 1 или 2, в которой активирующая онкогенная мутация представляет собой мутацию KRAS.

4. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 3, в которой мутация KRAS представляет собой мутацию G12.

5. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 4, в которой мутацию KRAS G12 выбирают из мутаций KRAS G12D, G12V, G12S, G12C, G12A и G12R.

6. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 4, в которой мутацию KRAS G12 выбирают из мутаций KRAS G12D, G12V и G12C.

7. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из пп. 3-6, в которой мутация KRAS представляет собой мутацию G13.

8. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 7, в которой мутация KRAS G13 представляет собой мутацию KRAS G13D.

9. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из пп. 1 или 2, в которой активирующая онкогенная мутация представляет собой мутацию H-RAS или N-RAS.

10. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из пп. 1-9, в которой мРНК имеет открытую рамку считывания, кодирующую конкатемер из двух или более пептидов с активирующей онкогенной мутацией.

11. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 10, в которой конкатемер содержит 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 пептидов с активирующей онкогенной мутацией.

12. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 10, в которой конкатемер содержит 4 пептида с активирующей онкогенной мутацией.

13. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 12, в которой конкатемер содержит KRAS-пептиды с активирующей онкогенной мутацией G12D, G12V, G12C и G13D.

14. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из пп. 1-9, в которой композиция содержит 1, 2, 3 или 4 мРНК, кодирующие 1, 2, 3 или 4 пептида с активирующей онкогенной мутацией.

15. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 14, в которой композиция содержит 4 мРНК, кодирующие 4 пептида с активирующей онкогенной мутацией.

16. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 16, в которой 4 мРНК кодируют KRAS-пептиды с активирующей онкогенной мутацией G12D, G12V, G12C и G13D.

17. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из пп. 1-16, в которой пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 10-30, 15-25 или 20-25 аминокислот.

18. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 17, в которой пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислот.

19. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 18, в которой пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 25 аминокислот.

20. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция, содержащая:

одну или более первых мРНК, каждая из которых содержит открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, и необязательно одну или более вторых мРНК,

каждая из которых содержит открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека, и необязательно при этом первая мРНК и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении, выбранном из группы, состоящей из 1: 1, 2: 1, 3: 1, 4: 1, 5: 1, 6: 1, 7: 1, 8: 1, 9: 1 или 10: 1; и

фармацевтически приемлемый носитель.

21. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 20, содержащая одну или более мРНК, каждая из которых содержит открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека.

22. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 21, в которой конститутивно активный полипептид STING человека содержит одну или более мутаций, выбранных из группы, состоящей из V147L, N154S, V155M, R284M, R284K, R284T, E315Q, R375A и их комбинаций.

23. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 22, в которой конститутивно активный полипептид STING человека содержит мутацию V155M.

24. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 22, в которой конститутивно активный полипептид STING человека содержит мутации V147L/N154S/V155M.

25. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 22, в которой конститутивно активный полипептид STING человека содержит мутации R284M/V147L/N154S/V155M.

26. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 21, в которой конститутивно активный полипептид STING человека содержит аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 1–10 и 164.

27. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из пп. 21–26, в которой мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит 3'-НТО, содержащую по меньшей мере один сайт связывания микроРНК miR-122.

28. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 21, в которой конститутивно активный полипептид STING человека содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1.

29. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 21, в которой мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 170.

30. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из пп. 20–29, в которой KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией выбирают из G12D, G12V, G12S, G12C, G12A, G12R и G13D.

31. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 30, в которой KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией выбирают из G12D, G12V, G12C и G13D.

32. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из пп. 20–31, в которой KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 10–30, 15–25 или 20–25 аминокислот, предпочтительно имеет длину 25 аминокислот.

33. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 32, в которой пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 25 аминокислот.

34. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из пп. 20–33, в которой композиция содержит 1, 2, 3 или 4 мРНК, кодирующие 1, 2, 3 или 4 KRAS-пептида с активирующей онкогенной мутацией.

35. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 34, в которой композиция содержит 4 мРНК, кодирующие 4 KRAS-пептида с активирующей онкогенной мутацией.

36. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 35, в которой 4 KRAS-пептида с активирующей онкогенной мутацией содержат G12D, G12V, G12C и G13D.

37. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 36, содержащая первую, вторую, третью, четвертую и пятую мРНК, причем

первая мРНК содержит открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12D;

вторая мРНК содержит открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12V;

третья мРНК содержит открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12C;

четвертая мРНК содержит открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G13D; и

пятая мРНК содержит открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека, необязательно

при этом первая, вторая, третья, четвертая и пятая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING, выбранном из группы, состоящей из 1: 1, 2: 1, 3: 1, 4: 1, 5: 1, 6: 1, 7: 1,

8: 1, 9: 1 или 10: 1.

38. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 37, в которой KRAS-пептиды с активирующей онкогенной мутацией содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, указанной в SEQ ID NO: 36-41, 72 и 125.

39. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 38, в которой KRAS-пептиды с активирующей онкогенной мутацией содержат аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 39-41 и 72.

40. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 39, в которой мРНК, кодирующая KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержит нуклеотидные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 126-128 и 132.

41. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из пп. 20-33, в которой мРНК содержит открытую рамку считывания, кодирующую конкатемер из двух или более KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией.

42. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 41, в которой конкатемер содержит 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией.

43. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 42, в которой конкатемер содержит 4 KRAS-пептида с активирующей онкогенной мутацией.

44. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 43, в которой конкатемер содержит G12D, G12V, G12C и G13D.

45. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 44, в которой конкатемер содержит от N- к C-концу G12D, G12V, G13D и G12C.

46. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 44, в которой конкатемер содержит от N- к C-концу G12C, G13D, G12V и G12D.

47. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 44, в которой конкатемер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, указанной в SEQ ID NO: 42-47, 73 и 137.

48. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 47, в которой мРНК, кодирующая конкатемер, содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, указанной в SEQ ID NO: 129-131, 133 и 138.

49. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 20, в которой первая мРНК содержит открытую рамку считывания,

кодирующую конкатемер из 4 KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией, причем конкатемер содержит от N- к C-концу G12D, G12V, G13D и G12C, и вторая мРНК содержит открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека, при этом конститутивно активный полипептид STING человека содержит мутацию V155M, причем первая мРНК и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING, выбранном из группы, состоящей из 1: 1, 2: 1, 3: 1, 4: 1, 5: 1, 6: 1, 7: 1, 8: 1, 9: 1 или 10: 1.

50. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 49, в которой первая мРНК и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 5: 1.

51. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по пп. 49-50, в которой конститутивно активный полипептид STING человека содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1.

52. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 51, в которой мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 170.

53. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из пп. 49-52, в которой мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит 3'-НТО, содержащую по меньшей мере один сайт связывания микроРНК miR-122.

54. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из пп. 49-53, в которой конкатемер содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 137.

55. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 54, в которой мРНК, кодирующая конкатемер из 4 KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией, содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 169.

56. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из пп. 1-55, в которой каждая мРНК содержит по меньшей мере одну химическую модификацию.

57. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 56, в которой химическую модификацию выбирают из группы, состоящей из псевдоуридина, N1-метилпсевдоуридина, 2-тиоуридина, 4'-тиоуридина, 5-метилцитозина, 2-тио-1-метил-1-дезазапсевдоуридина, 2-тио-1-метилпсевдоуридина, 2-тио-5-азауридина, 2-тиодигидропсевдоуридина, 2-тиодигидроуридина, 2-

тиопсевдоуридина, 4-метокси-2-тиопсевдоуридина, 4-метоксипсевдоуридина, 4-тио-1-метилпсевдоуридина, 4-тиопсевдоуридина, 5-азауридина, дигидропсевдоуридина, 5-метилуридина, 5-метилуридина, 5-метоксиуридина и 2'-О-метилуридина.

58. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 56, в которой химическую модификацию выбирают из группы, состоящей из псевдоуридина или аналога псевдоуридина.

59. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 56, в которой химическая модификация представляет собой N1-метилпсевдодуридин.

60. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из пп. 1–59, в которой каждую

мРНК вводят в состав в одной и той же или разных липидных наночастиц.

61. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из пп. 20–59, в которой каждую мРНК, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, вводят в состав одной и той же или разных липидных наночастиц, и каждую мРНК, кодирующую конститутивно активный STING человека, вводят в состав в одной и той же или разных липидных наночастиц.

62. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 61, в которой каждую мРНК, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, вводят в состав одной и той же липидной наночастицы, и каждую мРНК, кодирующую конститутивно активный STING человека, вводят в состав разных липидных наночастиц.

63. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 61, в которой каждую мРНК, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, вводят в состав одной и той же липидной наночастицы, и каждую мРНК, кодирующую конститутивно активный STING человека, вводят в состав одной и той же липидной наночастицы, как и каждую мРНК, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией.

64. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 61, в которой каждую мРНК, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, вводят в состав разных липидных наночастиц, и каждую мРНК, кодирующую конститутивно активный STING человека, вводят в состав одной и той же липидной наночастицы, как и каждую мРНК, кодирующую каждый KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией.

65. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из пп. 60-64, в которой липидная наночастица имеет мольное соотношение около 20-60% ионизируемого аминолипида: 5-25% фосфолипида: 25-55% стерола; и содержит 0,5-15% ПЭГ-модифицированного липида.

66. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 65, в которой ионизируемый аминолипид выбирают из группы, состоящей, например, из 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана (DLin-KC2-DMA), дилинолеил-метил-4-диметиламинобутирата (DLin-MC3-DMA) и ди((Z)-нон-2-ен-1-ил) 9-((4-(диметиламино)бутаноил)окси)гептадеканедиоата (L319).

67. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 65, в которой ионизируемый аминолипид содержит соединение любой из формул (I), (IA), (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId) и (IIe).

68. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 67, в которой ионизируемый аминолипид содержит соединение формулы (I).

69. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по п. 68, в которой соединение формулы (I) представляет собой соединение 25.

70. Липидная наночастица, содержащая:

одну или более первых мРНК, выбранных из группы, состоящей из:

мРНК, содержащей открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12D;

мРНК, содержащей открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12V;

мРНК, содержащей открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12C;

мРНК, содержащей открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G13D;

мРНК, содержащей открытую рамку считывания, кодирующую конкатемер из 2, 3 или 4 KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией, причем KRAS-пептиды с активирующей онкогенной мутацией содержат G12D, G12V, G12C и G13D; и

любой комбинации мРНК, указанных в (a)-(d); и

одну или более вторых мРНК, каждая из которых содержит открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека, необязательно,

при этом первая мРНК и вторая мРНК присутствуют в массовом

соотношении KRAS: STING, выбранном из группы, состоящей из 1: 1, 2: 1, 3: 1, 4: 1, 5: 1, 6: 1, 7: 1, 8: 1, 9: 1 или 10: 1.

71. Липидная наночастица по п. 70, в которой первая мРНК содержит открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12D.

72. Липидная наночастица по п. 70, в которой первая мРНК содержит открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12V.

73. Липидная наночастица по п. 70, в которой первая мРНК содержит открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12C.

74. Липидная наночастица по п. 70, в которой первая мРНК содержит открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G13D.

75. Липидная наночастица по п. 70, в которой первая мРНК содержит комбинацию мРНК, указанных в (a)-(d).

76. Липидная наночастица по п. 70, в которой первая мРНК содержит открытую рамку считывания, кодирующую конкатемер из 2 KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией.

77. Липидная наночастица по п. 70, в которой первая мРНК содержит открытую рамку считывания, кодирующую конкатемер из 3 KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией.

78. Липидная наночастица по п. 70, в которой первая мРНК содержит открытую рамку считывания, кодирующую конкатемер из 4 KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией.

79. Липидная наночастица по любому из пп. 70-78, в которой каждый KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 20, 21, 22, 23, 24, или 25 аминокислот.

80. Липидная наночастица по п. 79, в которой каждый KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией имеет длину 25 аминокислот.

81. Липидная наночастица по любому из пп. 70-75, в которой KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, указанной в SEQ ID NO: 39, 40, 72 и 41.

82. Липидная наночастица по любому из пп. 70-75, в которой мРНК, кодирующая KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, указанной в SEQ ID NO: 126, 127, 128 и 132.

83. Липидная наночастица по п. 78, в которой конкатемер

содержит от N- к C-концу G12D, G12V, G13D и G12C.

84. Липидная наночастица по п. 78, в которой конкатемер содержит от N- к C-концу G12C, G13D, G12V и G12D.

85. Липидная наночастица по п. 78, в которой конкатемер содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 137.

86. Липидная наночастица по п. 78, в которой мРНК, кодирующая конкатемер из 4 KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией, содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 169.

87. Липидная наночастица по любому из пп. 70-86, в которой конститутивно активный полипептид STING человека содержит мутацию V155M.

88. Липидная наночастица по п. 87, в которой конститутивно активный полипептид STING человека содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1.

89. Липидная наночастица по п. 87, в которой мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 170.

90. Липидная наночастица по любому из пп. 87-89, в которой мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит 3'-НТО, содержащую по меньшей мере один сайт связывания микроРНК miR-122.

91. Липидная наночастица по п. 90, в которой сайт связывания микроРНК miR-122 содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 175.

92. Липидная наночастица по любому из пп. 70-91, в которой первая и/или вторая мРНК содержит 5'-НТО, содержащую нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 176.

93. Липидная наночастица по п. 92, в которой каждая из первой и второй мРНК содержит поли(А)-хвост.

94. Липидная наночастица по п. 83, в которой поли(А)-хвост содержит около 100 нуклеотидов.

95. Липидная наночастица по любому из пп. 92-94, в которой каждая из первой и второй мРНК содержит структуру 5'-кэп 1.

96. Липидная наночастица по п. 70, содержащая

(i) первую мРНК, содержащую нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 167; и

(ii) вторую мРНК, содержащую нуклеотидную

последовательность, указанную в SEQ ID NO: 168.

97. Липидная наночастица по любому из пп. 70-96, в которой каждая из первой и второй мРНК содержит по меньшей мере одну химическую модификацию.

98. Липидная наночастица по п. 97, в которой химическую модификацию выбирают из группы, состоящей из псевдоуридина, N1-метилпсевдоуридина, 2-тиоуридина, 4'-тиоуридина, 5-метилцитозина, 2-тио-1-метил-1-дезазапсевдоуридина, 2-тио-1-метилпсевдоуридина, 2-тио-5-азауридина, 2-тиодигидропсевдоуридина, 2-тиодигидроуридина, 2-тиопсевдоуридина, 4-метокси-2-тиопсевдоуридина, 4-метоксипсевдоуридина, 4-тио-1-метилпсевдоуридина, 4-тиопсевдоуридина, 5-азауридина, дигидропсевдоуридина, 5-метилуридина, 5-метилуридина, 5-метоксиуридина и 2'-О-метилуридина.

99. Липидная наночастица по п. 97, в которой химическую модификацию выбирают из группы, состоящей из псевдоуридина или аналога псевдоуридина.

100. Липидная наночастица по п. 97, в которой химическая модификация представляет собой N1-метилпсевдоуридин.

101. Липидная наночастица по п. 97, в которой первая и/или вторая мРНК полностью модифицирована N1-метилпсевдоуридином.

102. Липидная наночастица по любому из пп. 70-101, причем липидная наночастица имеет мольное соотношение около 20-60% ионизируемого аминолипида: 5-25% фосфолипида: 25-55% стерола; и содержит 0,5-15% ПЭГ-модифицированного липида.

103. Липидная наночастица по п. 102, в которой ионизируемый аминолипид выбирают из группы, состоящей, например, из 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана (DLin-KC2-DMA), дилинолеил-метил-4-диметиламинобутирата (DLin-MC3-DMA) и ди((Z)-нон-2-ен-1-ил) 9-((4-(диметиламино)бутаноил)окси)гептадеканедиоата (L319).

104. Липидная наночастица по п. 102, в которой ионизируемый аминолипид содержит соединение любой из формул (I), (IA), (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId) и (IIe).

105. Липидная наночастица по п. 104, в которой ионизируемый аминолипид представляет собой соединение формулы (I).

106. Липидная наночастица по п. 105, в которой соединение формулы (I) представляет собой соединение 25.

107. Липидная наночастица по любому из пп. 70-101, причем

липидная наночастица имеет мольное соотношение около 50% соединения 25: около 10% DSPC: около 38,5% холестерина; и содержит около 1,5% ПЭГ-DMG.

108. Липидная наночастица по любому из пп. 70-107, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 1: 1.

109. Липидная наночастица по любому из пп. 70-107, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 2: 1.

110. Липидная наночастица по любому из пп. 70-107, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 3: 1.

111. Липидная наночастица по любому из пп. 70-107, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 4: 1.

112. Липидная наночастица по любому из пп. 70-107, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 5: 1.

113. Липидная наночастица по любому из пп. 70-107, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 6: 1.

114. Липидная наночастица по любому из пп. 70-107, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 7: 1.

115. Липидная наночастица по любому из пп. 70-107, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 8: 1.

116. Липидная наночастица по любому из пп. 70-107, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 9: 1.

117. Липидная наночастица по любому из пп. 70-107, в которой первая и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING 10: 1.

118. Липидная наночастица, содержащая:

(i) первую мРНК, содержащую нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 167; и

(ii) вторую мРНК, содержащую нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 168,

причем каждая из первой и второй мРНК является полностью модифицированной N1-метилпсевдоуридином, и

при этом первая мРНК и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении 5: 1.

119. Липидная наночастица по п. 118, причем липидная наночастица имеет мольное соотношение около 50% соединения 25: около 10% DSPC: около 38,5% холестерина; и содержит около 1,5% ПЭГ-DMG.

120. Фармацевтическая композиция, содержащая липидную наночастицу по любому из пп. 70-119 и фармацевтически приемлемый носитель.

121. Фармацевтическая композиция по п. 120, в которой фармацевтически приемлемый носитель содержит буферный раствор.

122. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 120-121, которую готовят для внутримышечной доставки.

123. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из пп. 1-69, липидная наночастица по любому из пп. 70-119 и необязательный фармацевтически приемлемый носитель, или фармацевтическая композиция по любому из пп. 120-122 для применения в лечении или задержке прогрессирования рака у индивидуума, причем лечение включает введение липидной наночастицы или композиции в комбинации со второй композицией, при этом вторая композиция содержит полипептид-ингибитор контрольной точки и необязательный фармацевтически приемлемый носитель.

124. Применение липидной наночастицы по любому из пп. 70-119 и необязательного фармацевтически приемлемого носителя при изготовлении лекарственного средства для лечения или задержки прогрессирования рака у индивидуума, причем лекарственное средство содержит липидную наночастицу и необязательный фармацевтически приемлемый носитель и при этом лечение включает введение лекарственного средства в комбинации с композицией, содержащей полипептид-ингибитор контрольной точки и необязательный фармацевтически приемлемый носитель.

125. Набор, содержащий контейнер, содержащий иммуномодулирующую терапевтическую композицию по любому из пп. 1-69, липидную наночастицу по любому из пп. 70-119 и необязательный фармацевтически приемлемый носитель, или фармацевтическую композицию по любому из пп. 120-122 и листок-вкладыш, содержащий инструкции по введению иммуномодулирующей терапевтической композиции, липидной наночастицы или фармацевтической композиции для лечения или задержки

прогрессирования рака у индивидуума.

126. Набор по п. 125, в котором листок-вкладыш дополнительно содержит инструкции по введению липидной наночастицы или фармацевтической композиции в комбинации с композицией, содержащей полипептид-ингибитор контрольной точки и необязательный фармацевтически приемлемый носитель для лечения или задержки прогрессирования рака у индивидуума.

127. Набор, содержащий лекарственное средство, содержащее иммуномодулирующую терапевтическую композицию по любому из пп. 1-69, липидную наночастицу по любому из пп. 70-119 и необязательный фармацевтически приемлемый носитель, или фармацевтическую композицию по любому из пп. 120-122 и листок-вкладыш, содержащий инструкции по введению лекарственного средства отдельно или в комбинации с композицией, содержащей полипептид-ингибитор контрольной точки и необязательный фармацевтически приемлемый носитель, для лечения или задержки прогрессирования рака у индивидуума.

128. Набор по п. 127, причем набор дополнительно содержит листок-вкладыш, содержащий инструкции по введению первого лекарственного средства до, во время или после введения второго лекарственного средства для лечения или задержки прогрессирования рака у индивидуума.

129. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из пп. 1-69, липидная наночастица по любому из пп. 70-119, композиция по любому из пп. 120-122, применение по пп. 123-124 или набор по любому из пп. 125-128, в которых полипептид-ингибитор контрольной точки ингибирует PD1, PD-L1, CTLA4 или их комбинацию.

130. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из пп. 1-69, липидная наночастица по любому из пп. 70-119, композиция по любому из пп. 120-122, применение по пп. 123-124 или набор по любому из пп. 125-128, в которых полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой антитело.

131. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из пп. 1-69, липидная наночастица по любому из пп. 70-119, композиция по любому из пп. 120-122, применение по пп. 123-124 или набор по любому из пп. 125-128, в которых полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой антитело, выбранное из анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает CTLA4, анти-PD1

антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает PD1, анти-PD-L1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает PD-L1, и их комбинацию.

132. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из пп. 1-69, липидная наночастица по любому из пп. 70-119, композиция по любому из пп. 120-122, применение по пп. 123-124 или набор по любому из пп. 125-128, в которых полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой анти-PD-L1 антитело, выбранное из атезолизумаба, авелумаба или дурвалумаба.

133. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из пп. 1-69, липидная наночастица по любому из пп. 70-119, композиция по любому из пп. 120-122, применение по пп. 123-124 или набор по любому из пп. 125-128, в которых полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой анти-CTLA-4 антитело, выбранное из тремелимумаба или ипилимумаба.

134. Иммуномодулирующая терапевтическая композиция по любому из пп. 1-69, липидная наночастица по любому из пп. 70-119, композиция по любому из пп. 120-122, применение по пп. 123-124 или набор по любому из пп. 125-128, в которых полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой анти-PD1 антитело, выбранное из ниволумаба или пембролизумаба.

135. Способ снижения или уменьшения размера опухоли, ингибирования роста опухоли или индукции противоопухолевого ответа у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту иммуномодулирующей терапевтической композиции по любому из пп. 1-69, липидной наночастицы по любому из пп. 70-119 или композиции по любому из пп. 120-122.

136. Способ по п. 135, в котором иммуномодулирующую терапевтическую композицию, липидную наночастицу или композицию вводят в комбинации с противораковым терапевтическим агентом.

137. Способ по п. 136, в котором иммуномодулирующую терапевтическую композицию, липидную наночастицу или композицию вводят в комбинации с полипептидом-ингибитором контрольной точки или полинуклеотидом, кодирующим его.

138. Способ по п. 137, в котором полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с молекулой, выбранной из группы, состоящей из PD-1, PD-L1, TIM-3, VISTA, A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, IDO, KIR и LAG3.

139. Способ по любому из пп. 135-138, в котором рак выбирают из рака поджелудочной железы, брюшины, толстой кишки, тонкой кишки, желчных путей, легкого, эндометрия, яичника, половых путей, желудочно-кишечного тракта, шейки матки, желудка, мочевыводящих путей, ободочной кишки, прямой кишки и кроветворных и лимфоидных тканей.

140. Способ снижения или уменьшения размера опухоли, ингибирования роста опухоли или индукции противоопухолевого ответа у субъекта, нуждающегося в этом, включающий

введение субъекту иммуномодулирующей терапевтической композиции, содержащей: одну или более первых мРНК, каждая из которых содержит открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, и необязательно одну или более вторых мРНК, каждая из которых содержит открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека, и необязательно при этом первая мРНК и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении, выбранном из группы, состоящей из 1: 1, 2: 1, 3: 1, 4: 1, 5: 1, 6: 1, 7: 1, 8: 1, 9: 1 или 10: 1; и

фармацевтически приемлемый носитель,

тем самым снижая или уменьшая размер опухоли, ингибируя рост опухоли или индуцируя противоопухолевый ответ у субъекта.

141. Способ по п. 140, в котором композиция содержит 1, 2, 3 или 4 мРНК, кодирующие 1, 2, 3 или 4 KRAS-пептида с активирующей онкогенной мутацией.

142. Способ по п. 141, в котором композиция содержит 4 мРНК, кодирующие 4 KRAS-пептида с активирующей онкогенной мутацией.

143. Способ по п. 142, в котором 4 KRAS-пептида с активирующей онкогенной мутацией содержат G12D, G12V, G12C и G13D.

144. Способ по п. 140, включающий первую, вторую, третью, четвертую и пятую мРНК, при этом

первая мРНК содержит открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12D;

вторая мРНК содержит открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12V;

третья мРНК содержит открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12C;

четвертая мРНК содержит открытую рамку считывания,

кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G13D; и

пятая мРНК содержит открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека,

при этом первая, вторая, третья, четвертая и пятая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING, выбранном из группы, состоящей из 1: 1, 2: 1, 3: 1, 4: 1, 5: 1, 6: 1, 7: 1, 8: 1, 9: 1 или 10: 1.

145. Способ по п. 144, в котором KRAS-пептиды с активирующей онкогенной мутацией содержат аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 39-41 и 72.

146. Способ по п. 144, в котором мРНК, кодирующая KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержит нуклеотидные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 126-128 и 132.

147. Способ по п. 140, в котором мРНК имеет открытую рамку считывания, кодирующую конкатемер из двух или более KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией.

148. Способ по п. 147, в котором конкатемер содержит G12D, G12V, G12C и G13D.

149. Способ по п. 148, в котором конкатемер содержит от N- к C-концу G12D, G12V, G13D и G12C.

150. Способ по п. 148, в котором конкатемер содержит от N- к C-концу G12C, G13D, G12V и G12D.

151. Способ по п. 148, в котором конкатемер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, указанной в SEQ ID NO: 42-47, 73 и 137.

152. Способ по п. 148, в котором мРНК, кодирующая конкатемер, содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, указанной в SEQ ID NO: 129-131, 133 и 138.

153. Способ по любому из пп. 140-152, в котором конститутивно активный полипептид STING человека содержит мутацию V155M.

154. Способ по п. 153, в котором конститутивно активный полипептид STING человека содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1.

155. Способ по п. 154, в котором мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 170.

156. Способ по любому из пп. 153-155, в котором мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека,

содержит 3'-НТО, содержащую по меньшей мере один сайт связывания микроРНК miR-122.

157. Способ снижения или уменьшения размера опухоли, ингибирования роста опухоли или индукции противоопухолевого ответа у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту липидной наночастицы, содержащей:

(i) одну или более первых мРНК, выбранных из группы, состоящей из:

мРНК, содержащей открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12D;

мРНК, содержащей открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12V;

мРНК, содержащей открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G12C;

мРНК, содержащей открытую рамку считывания, кодирующую KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержащий G13D;

мРНК, содержащей открытую рамку считывания, кодирующую конкатемер из 2, 3 или 4 KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией, причем KRAS-пептиды с активирующей онкогенной мутацией содержат G12D, G12V, G12C и G13D; и

любой комбинации мРНК, указанных в (a)-(d); и

одной или более вторых мРНК, каждая из которых содержит открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека, необязательно,

при этом первая мРНК и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING, выбранном из группы, состоящей из 1: 1, 2: 1, 3: 1, 4: 1, 5: 1, 6: 1, 7: 1, 8: 1, 9: 1 или 10: 1,

тем самым снижая или уменьшая размер опухоли, ингибируя рост опухоли или индуцируя противоопухолевый ответ у субъекта.

158. Способ по п. 157, в котором липидная наночастица содержит

(i) комбинацию мРНК, указанных в (a)-(d); и

(ii) вторую мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека, причем конститутивно активный полипептид STING человека содержит мутацию V155M,

при этом первая мРНК и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING, выбранном из группы, состоящей из 1: 1, 2: 1, 3: 1, 4: 1, 5: 1, 6: 1, 7: 1, 8: 1, 9: 1 или 10: 1.

159. Способ по п. 158, в котором KRAS-пептиды с

активирующей онкогенной мутацией содержат аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 39-41 и 72.

160. Способ по п. 159, в котором мРНК, кодирующая KRAS-пептид с активирующей онкогенной мутацией, содержит нуклеотидные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 126-128 и 132.

161. Способ по п. 157, в котором липидная наночастица содержит

(i) первую мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую конкатемер из 4 KRAS-пептидов с активирующей онкогенной мутацией, причем конкатемер содержит от N- к С-концу G12D, G12V, G13D и G12C; и

(ii) вторую мРНК, содержащую открытую рамку считывания, кодирующую конститутивно активный полипептид STING человека, при этом конститутивно активный полипептид STING человека содержит мутацию V155M,

причем первая мРНК и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении KRAS: STING, выбранном из группы, состоящей из 1: 1, 2: 1, 3: 1, 4: 1, 5: 1, 6: 1, 7: 1, 8: 1, 9: 1 или 10: 1.

162. Способ по п. 161, в котором конкатемер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, указанной в SEQ ID NO: 42-47, 73 и 137.

163. Способ по п. 161, в котором мРНК, кодирующая конкатемер, содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, указанной в SEQ ID NO: 129-131, 133 и 138.

164. Способ по любому из пп. 157-163, в котором конститутивно активный полипептид STING человека содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1.

165. Способ по п. 164, в котором мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 170.

166. Способ по любому из пп. 164-165, в котором мРНК, кодирующая конститутивно активный полипептид STING человека, содержит 3'-НТО, содержащую по меньшей мере один сайт связывания микроРНК miR-122.

167. Способ по п. 157, в котором липидная наночастица содержит

(i) первую мРНК, содержащую нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 167; и

(ii) вторую мРНК, содержащую нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 168,

причем каждая из первой и второй мРНК является полностью модифицированной N1-метилпсевдоуридином, и при этом первая мРНК и вторая мРНК присутствуют в массовом соотношении 5: 1.

168. Способ по любому из пп. 157-167, в котором липидная наночастица имеет мольное соотношение около 20-60% ионизируемого аминолипида: 5-25% фосфолипида: 25-55% стерола; и содержит 0,5-15% ПЭГ-модифицированного липида.

169. Способ по п. 168, в котором липидная наночастица имеет мольное соотношение около 50% соединения 25: около 10% DSPC: около 38,5% холестерина; и содержит около 1,5% ПЭГ-DMG.

170. Способ по п. 169, в котором липидную наночастицу или композицию вводят при помощи внутримышечной инъекции.

171. Способ по любому из пп. 140-170, в котором противоопухолевый ответ включает Т-клеточный ответ.

172. Способ по п. 171, в котором Т-клеточный ответ включает CD8+ Т-клетки.

173. Способ по любому из пп. 140-172, дополнительно включающий введение второй композиции, содержащей полипептид-ингибитор контрольной точки или полинуклеотид, кодирующий его, и необязательный фармацевтически приемлемый носитель.

174. Способ по п. 173, в котором полипептид-ингибитор контрольной точки ингибирует PD1, PD-L1, CTLA4 или их комбинацию.

175. Способ по п. 174, в котором полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой антитело.

176. Способ по п. 175, в котором полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой антитело, выбранное из анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает CTLA4, анти-PD1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает PD1, анти-PD-L1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает PD-L1, и их комбинацию.

177. Способ по п. 176, в котором полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой анти-PD-L1 антитело, выбранное из атезолизумаба, авелумаба или дурвалумаба.

178. Способ по п. 176, в котором полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой анти-CTLA-4 антитело, выбранное из тремелимумаба или ипилимумаба.

179. Способ по п. 176, в котором полипептид-ингибитор контрольной точки представляет собой анти-PD1 антитело,

выбранное из ниволумаба или пембролизумаба.

180. Способ по любому из пп. 173–179, в котором композицию, содержащую полипептид-ингибитор контрольной точки, вводят при помощи внутривенной инъекции.

181. Способ по п. 180, в котором композицию, содержащую полипептид-ингибитор контрольной точки, вводят один раз каждые 2–3 недели.

182. Способ по п. 180, в котором композицию, содержащую полипептид-ингибитор контрольной точки, вводят один раз каждые 2 недели или один раз каждые 3 недели.

183. Способ по любому из пп. 173–179, в котором композицию, содержащую полипептид-ингибитор контрольной точки, вводят до, одновременно или после введения липидной наночастицы или композиции.

184. Способ по любому из пп. 140–183, в котором субъект имеет гистологически подтвержденную мутацию KRAS, выбранную из G12D, G12V, G13D или G12C.

185. Способ по любому из пп. 140–184, в котором субъект имеет гистологически подтвержденный подтип HLA, выбранный из HLA-A11 и/или HLA-C*08.

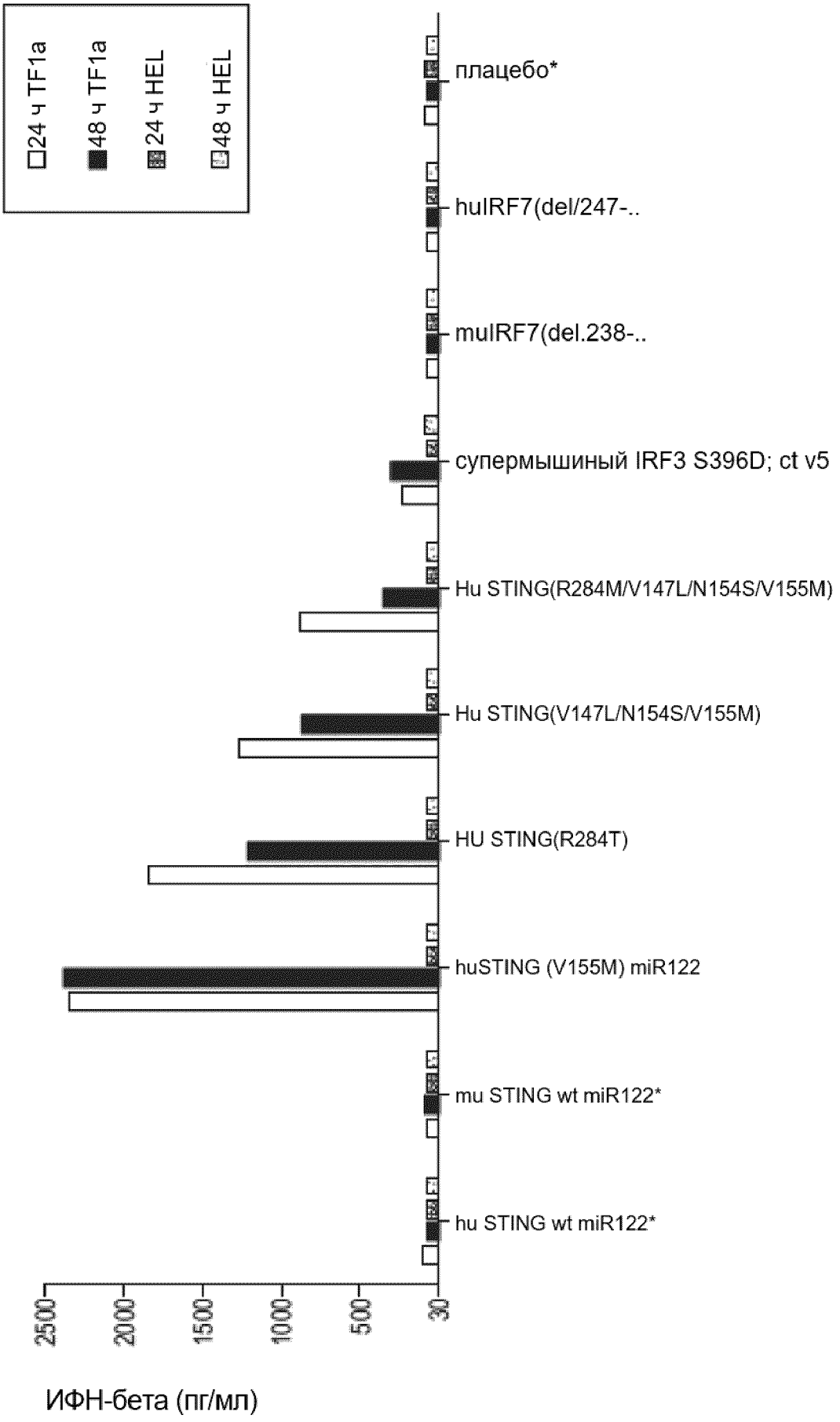
186. Способ по любому из пп. 140–185, в котором опухоль представляет собой метастатический колоректальный рак.

187. Способ по любому из пп. 140–185, в котором опухоль представляет собой немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ).

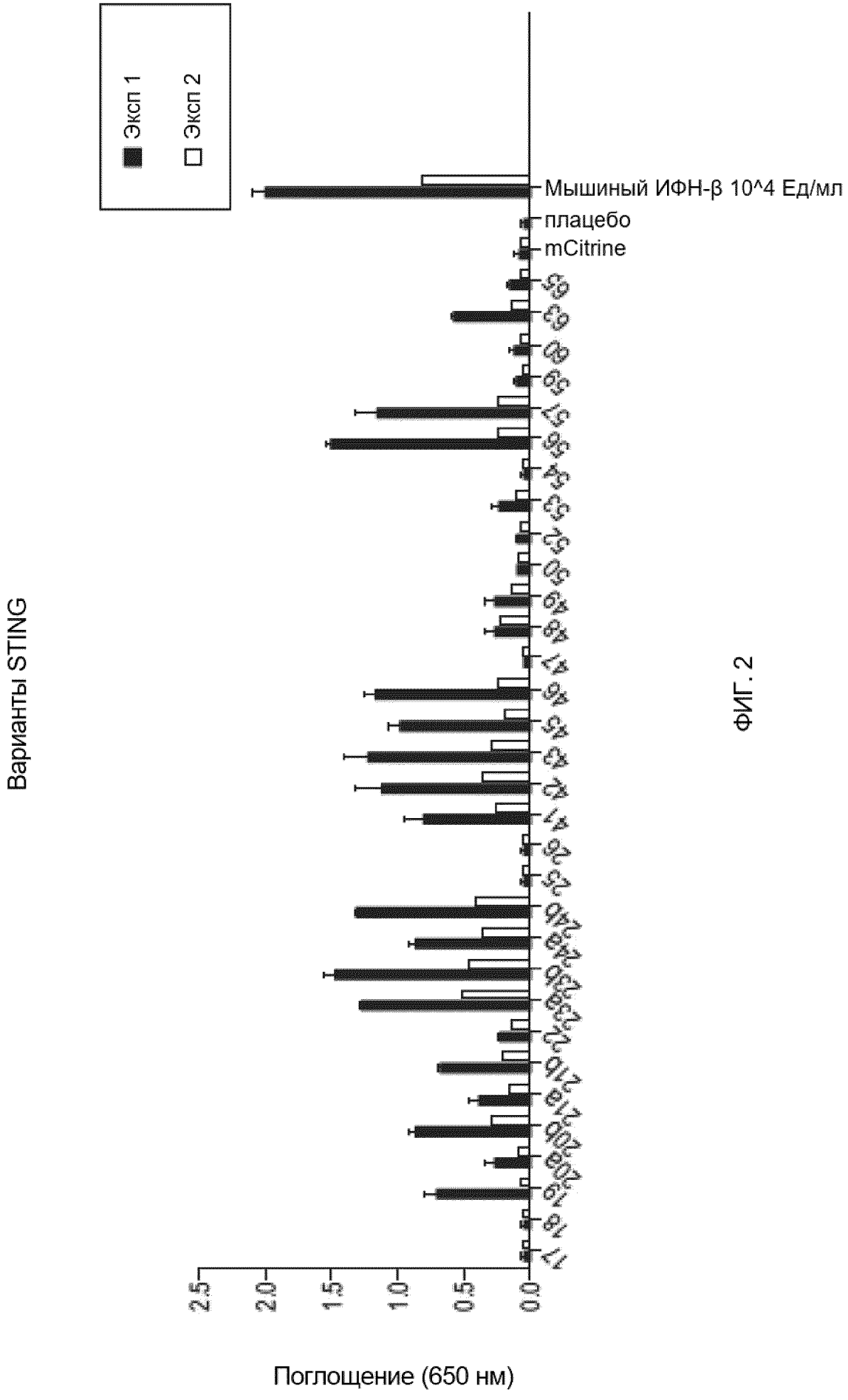
188. Способ по любому из пп. 140–185, в котором опухоль представляет собой рак поджелудочной железы.

189. Способ по любому из пп. 140–188, в котором субъекту вводят химиотерапевтический агент до, одновременно или после введения липидной наночастицы или композиции.

По доверенности


24 ч TF1a
48 ч TF1a
24 ч HEL
48 ч HEL
плацебо*
huIRF7(del/247-..
muIRF7(del.238-..
супермышиный IRF3 S396D; ct v5
Hu STING(R284M/V147L/N154S/V155M)
Hu STING(V147L/N154S/V155M)
HU STING(R284T)
huSTING (V155M) miR122
mu STING wt miR122*
hu STING wt miR122*
2500
2000
1500
1000
500
30
ИФН-бета (пг/мл)

ФИГ. 1


Эксп 1
Эксп 2
Мышиный ИФН-β 10^4 Ед/мл
плацебо
mCitrine
65
63
60
59
57
56
54
53
52
50
49
48
47
46
45
43
42
41
26
25
24AB
24B
23B
23AB
22
21B
21A
20B
20A
19
18
17
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Варианты STING
Поглощение (650 нм)

ФИГ. 2

Поглощение (650 нм)
0
1
2
1
2
3
4
5
ЗФБ
10^4 Ед/мл ИФН-бета
CA-IRF3

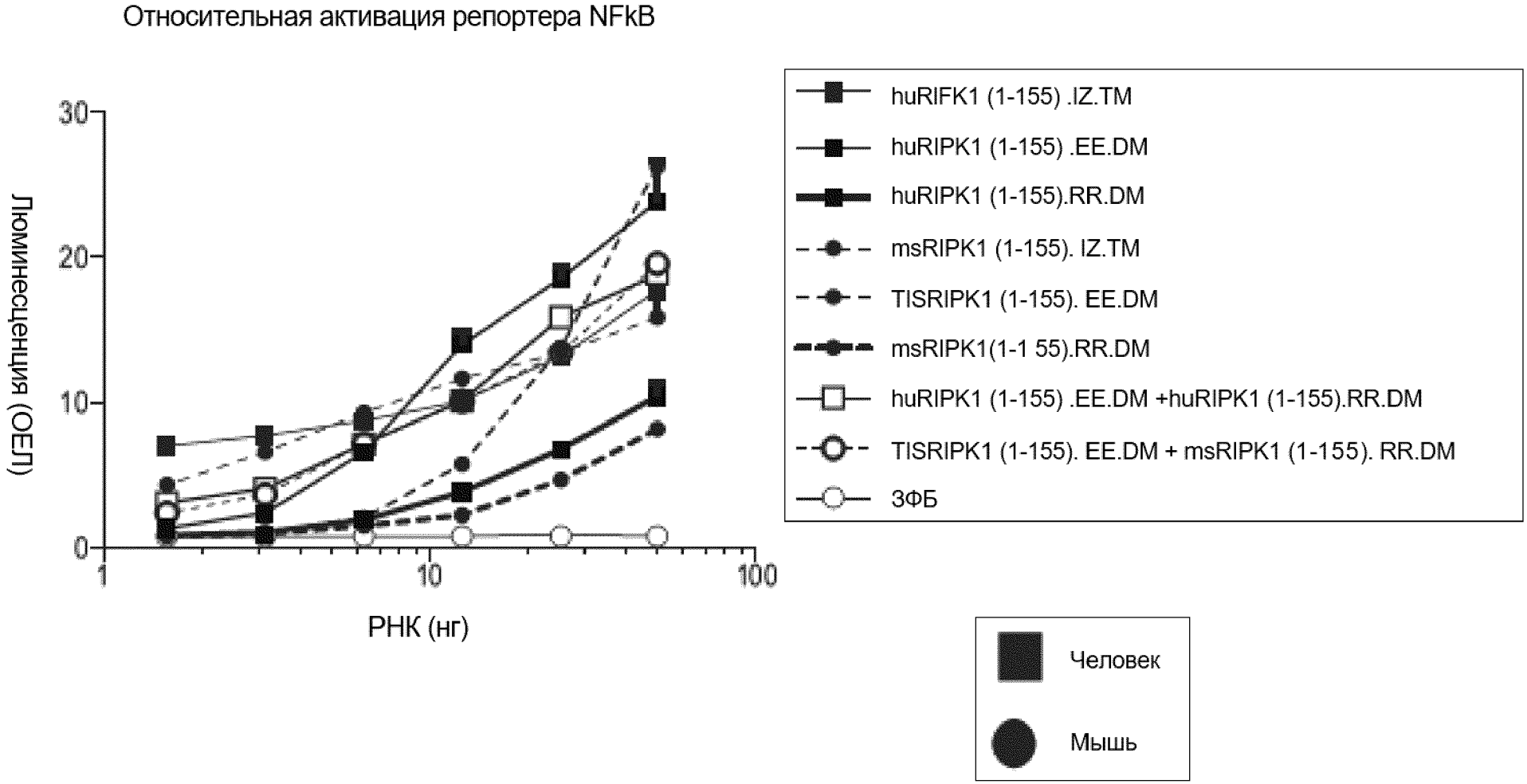
ФИГ. 3А


Поглощение (650 нм)
0
1
2
3
27
28
29
31
32
33
36
ЗФБ
10^4 Ед/мл ИФН-бета
ДТ
IRF7
CA-IRF7

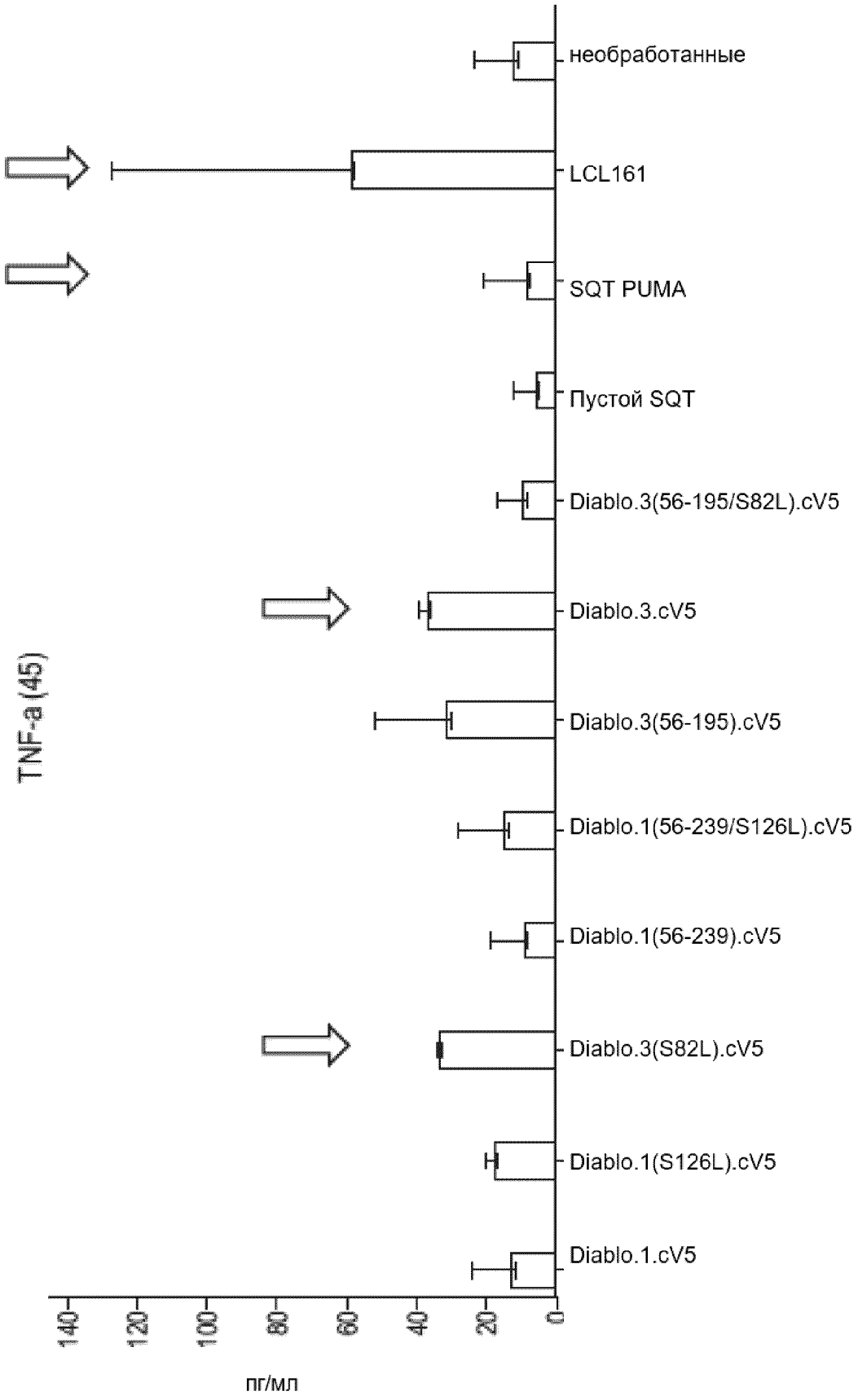
ФИГ. 3В

Относительный коэффициент ответа (ЕОП)
120
110
100
35
30
25
20
15
10
5
0
B16F10
MC38
HEK 293
КОНТРОЛЬ
КОНТРОЛЬ + ФНО-альфа
cFLIP
calKK-
calKK+ мутация домена pest

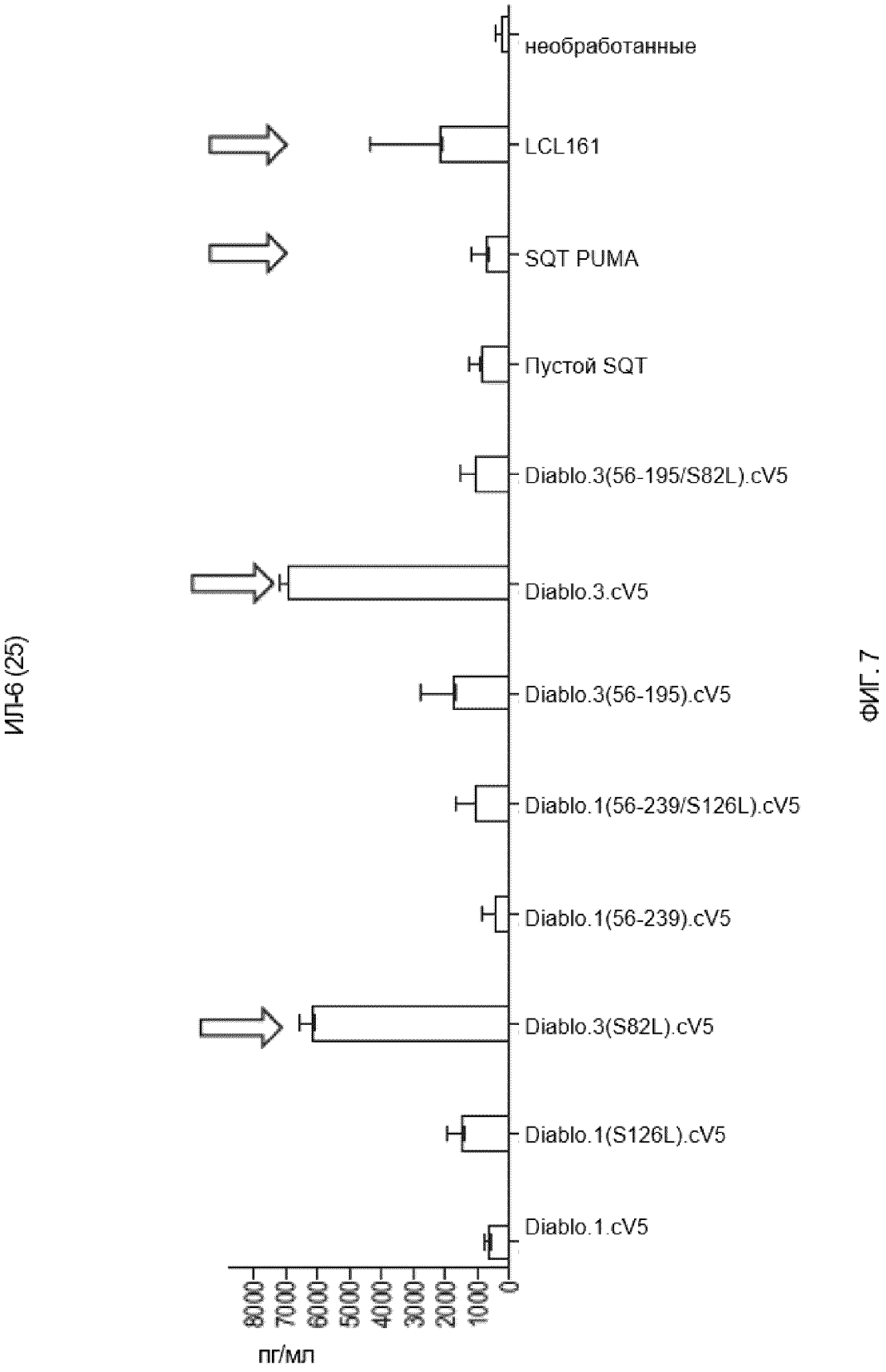
ФИГ. 4


Относительная активация репортера NFkB
Люминесценция (ОЕЛ)
30
20
10
0
1
10
100
РНК (нг)
huRIFK1 (1-155) .IZ.TM
huRIPK1 (1-155) .EE.DM
huRIPK1 (1-155).RR.DM
msRIPK1 (1-155). IZ.TM
TISRIPK1 (1-155). EE.DM
msRIPK1(1-1 55).RR.DM
huRIPK1 (1-155) .EE.DM +huRIPK1 (1-155).RR.DM
TISRIPK1 (1-155). EE.DM + msRIPK1 (1-155). RR.DM
ЗФБ
Человек
Мышь

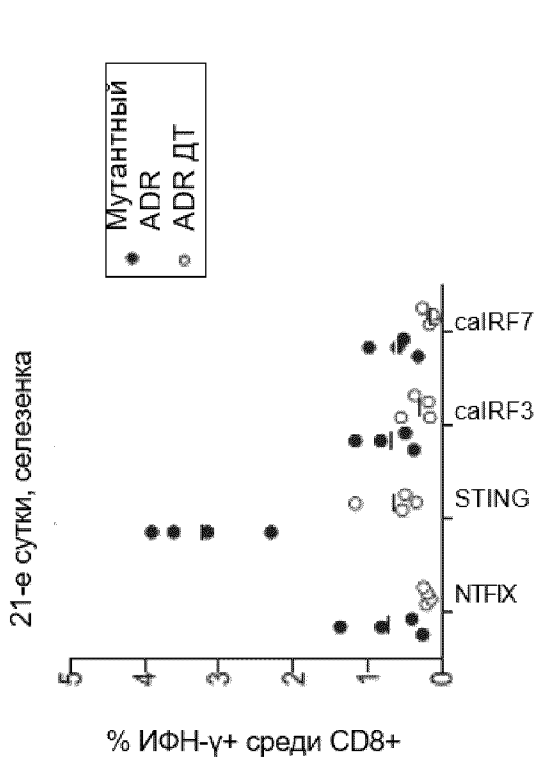
ФИГ. 5


TNF-a (45)
необработанные
LCL161
SQT PUMA
Пустой SQT
Diablo.3(56-195/S82L).cV5
Diablo.3.cV5
Diablo.3(56-195).cV5
Diablo.1(56-239/S126L).cV5
Diablo.1(56-239).cV5
Diablo.3(S82L).cV5
Diablo.1(S126L).cV5
Diablo.1.cV5
140
120
100
80
60
40
20
0
пг/мл

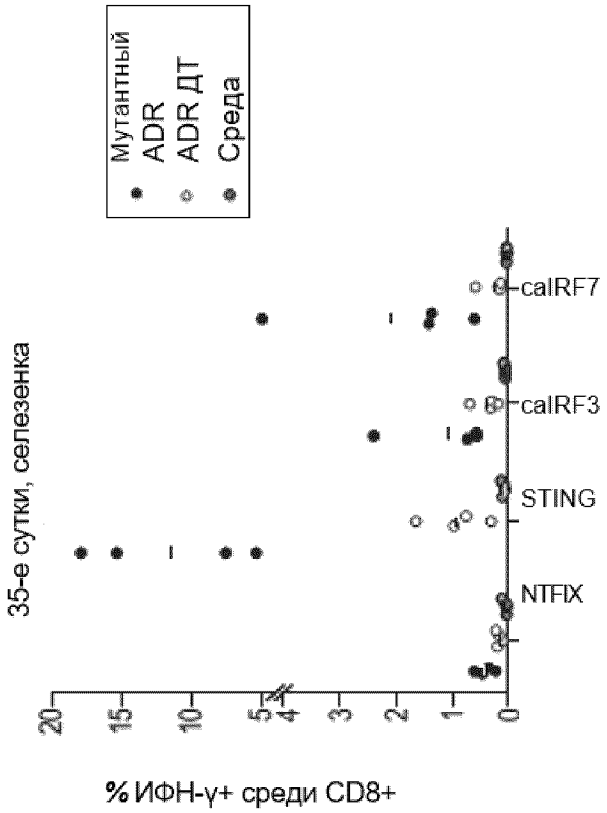
ФИГ. 6


ИЛ-6 (25)
необработанные
LCL161
SQT PUMA
Пустой SQT
Diablo.3(56-195/S82L).cV5
Diablo.3.cV5
Diablo.3(56-195).cV5
Diablo.1(56-239/S126L).cV5
Diablo.1(56-239).cV5
Diablo.3(S82L).cV5
Diablo.1(S126L).cV5
Diablo.1.cV5
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
пг/мл

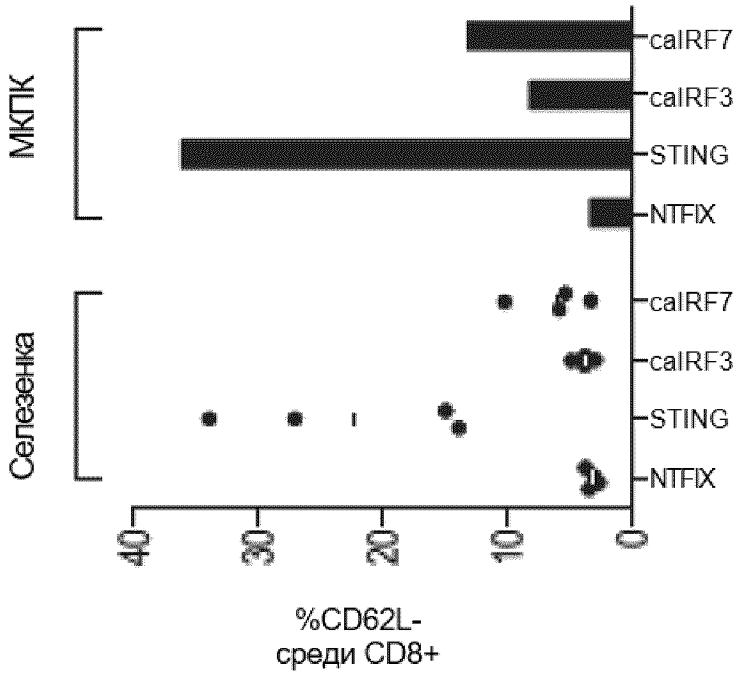
ФИГ. 7


Мутантный
ADR
ADR ДТ
21-е сутки, селезенка
calRF7
calRF3
STING
NTFIX
0
1
2
3
4
5
% ИФН-γ+ среди CD8+

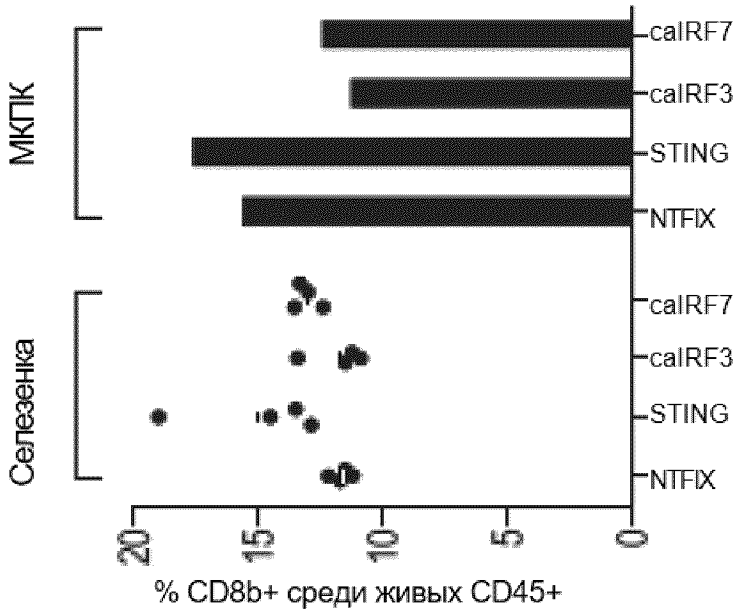
ФИГ. 8A


Мутантный
ADR
ADR ДТ
Среда
35-е сутки, селезенка
calRF7
calRF3
STING
NTFIX
0
1
2
3
4
5
10
15
20
% ИФН-γ+ среди CD8+

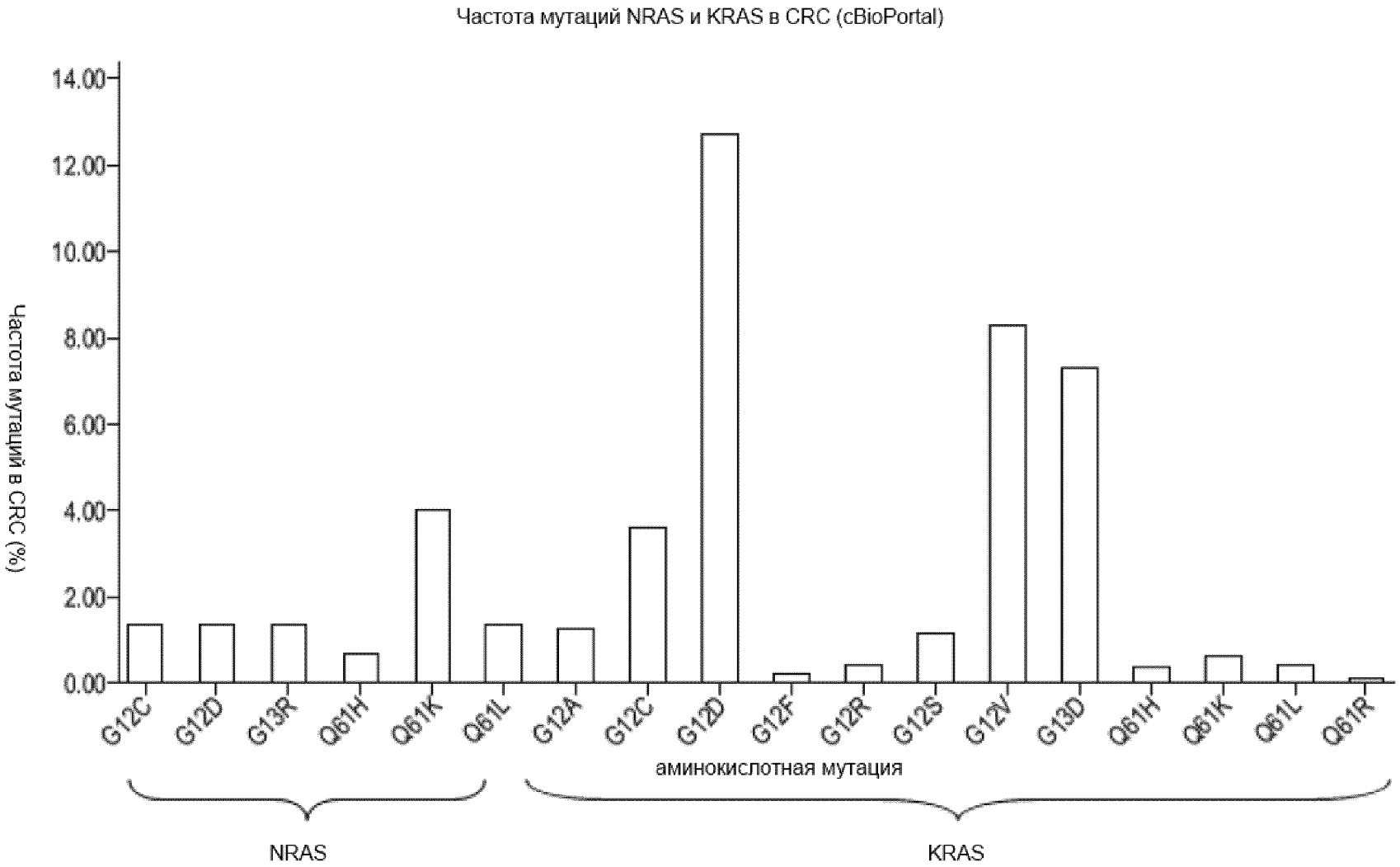
ФИГ. 8B


МКПК
Селезенка
calRF7
calRF3
STING
NTFIX
calRF7
calRF3
STING
NTFIX
40
30
20
10
0
%CD62L-
среди CD8+

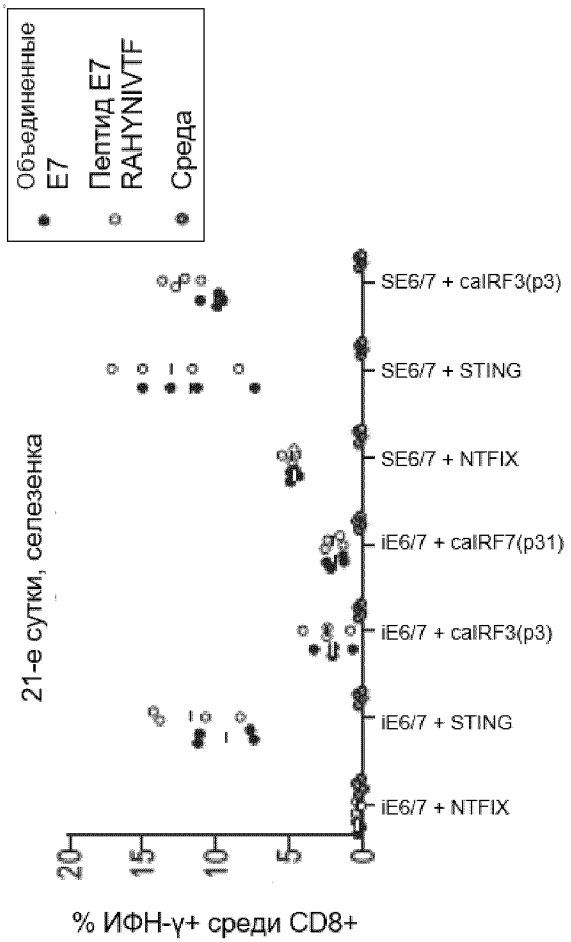
ФИГ. 9В


МКПК
Селезенка
calRF7
calRF3
STING
NTFIX
calRF7
calRF3
STING
NTFIX
20
15
10
5
0
% CD8b+ среди живых CD45+

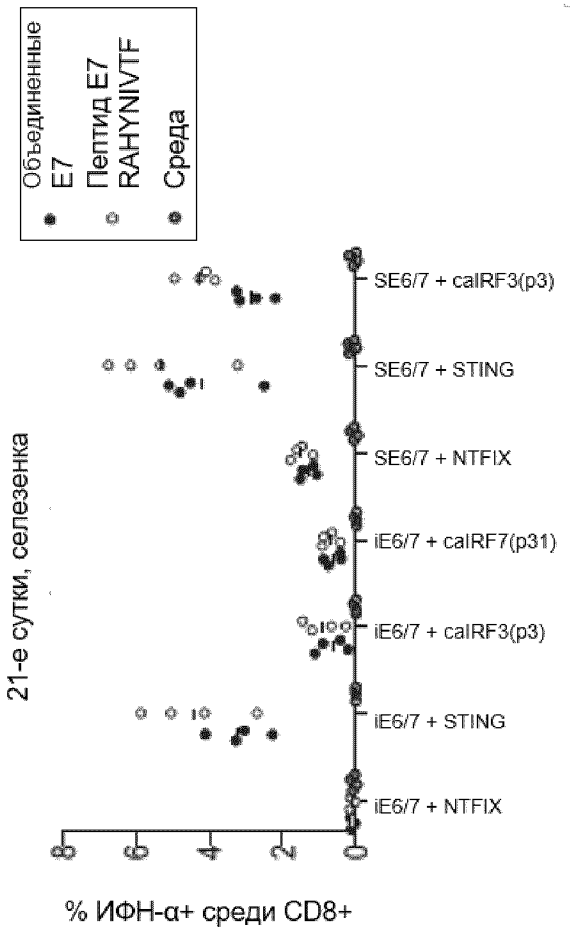
ФИГ. 9А


Частота мутаций NRAS и KRAS в CRC (cBioPortal)
Частота мутаций в CRC (%)
14.00
12.00
10.00
8.00
6.00
4.00
2.00
0.00
G12C
G12D
G13R
Q61H
Q61K
Q61L
G12A
G12C
G12D
G12F
G12R
G12S
G12V
G13D
Q61H
Q61K
Q61L
Q61R
аминокислотная мутация
NRAS
KRAS

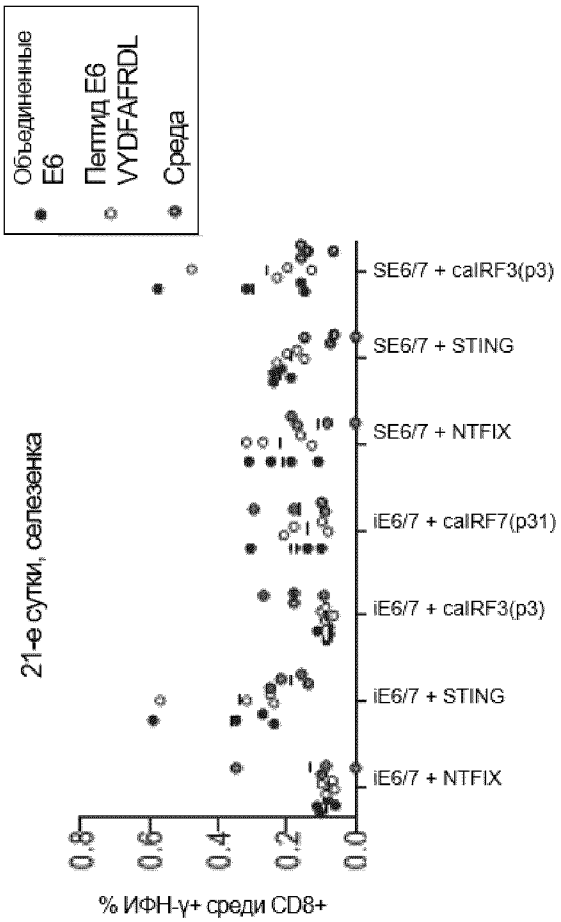
ФИГ. 10



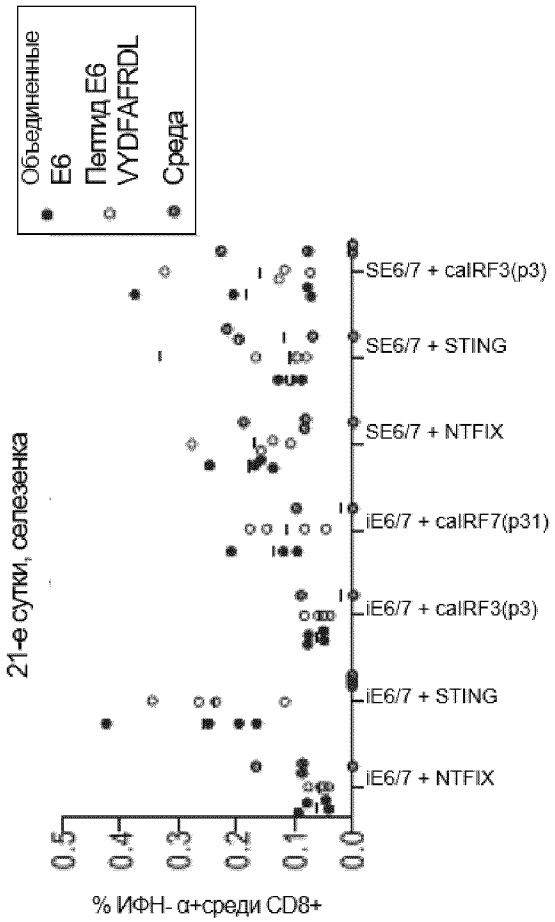

ФИГ. 11A



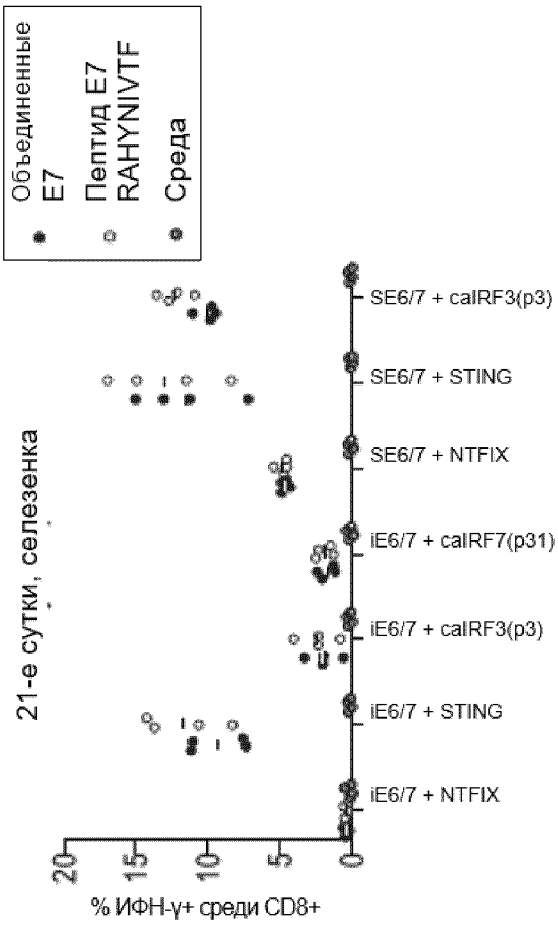

ФИГ. 11B



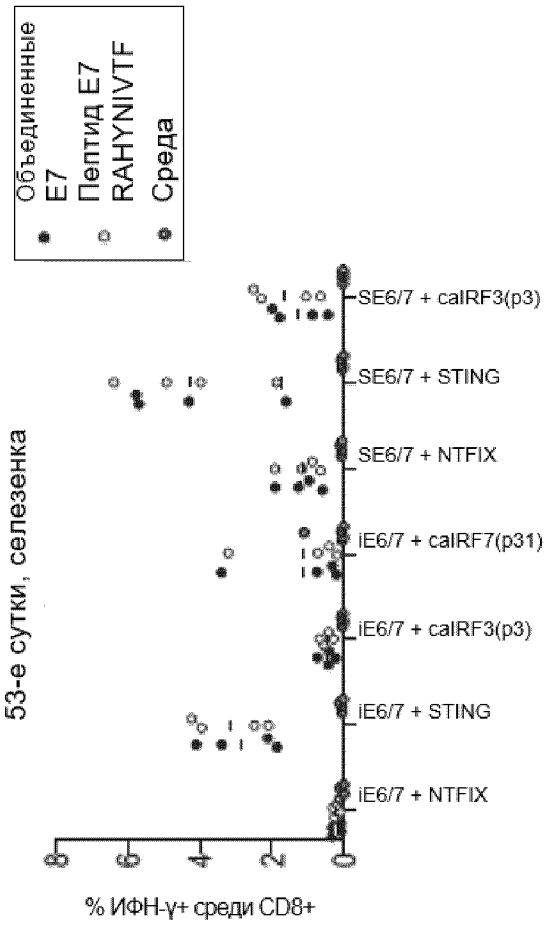

ФИГ. 12A



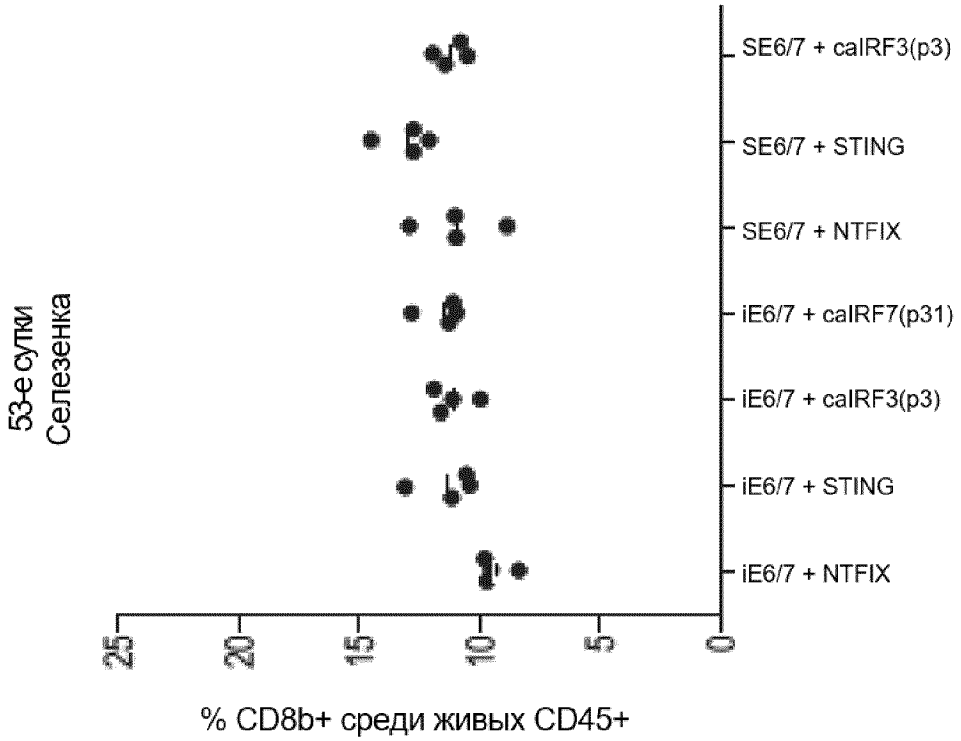

ФИГ. 12B



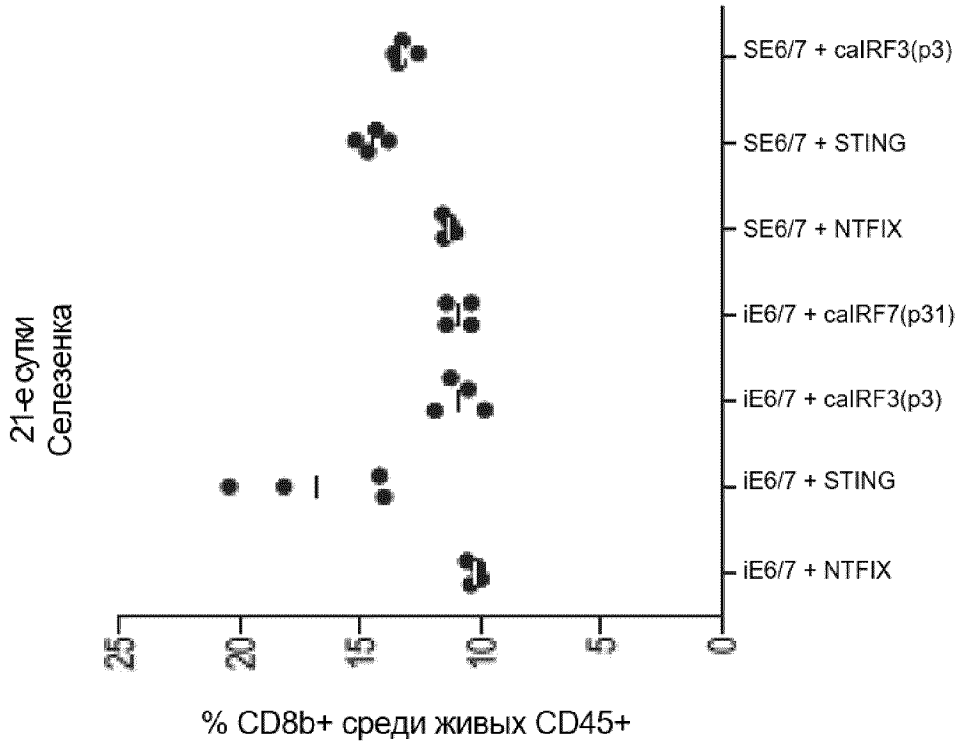

ФИГ. 13А



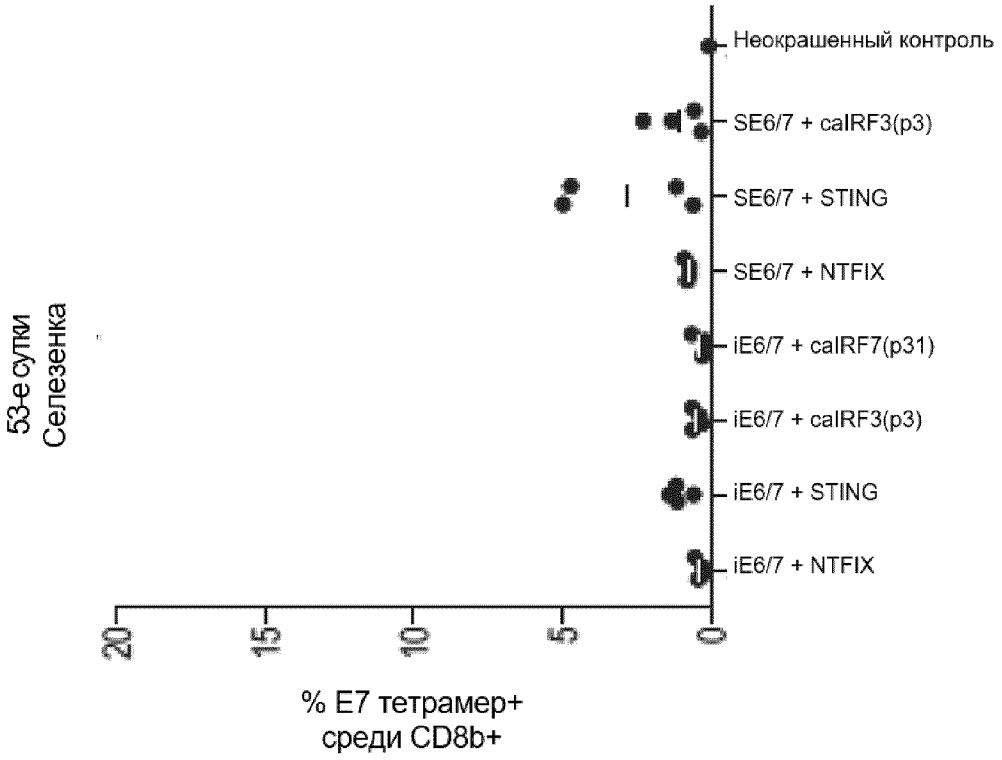

ФИГ. 13В



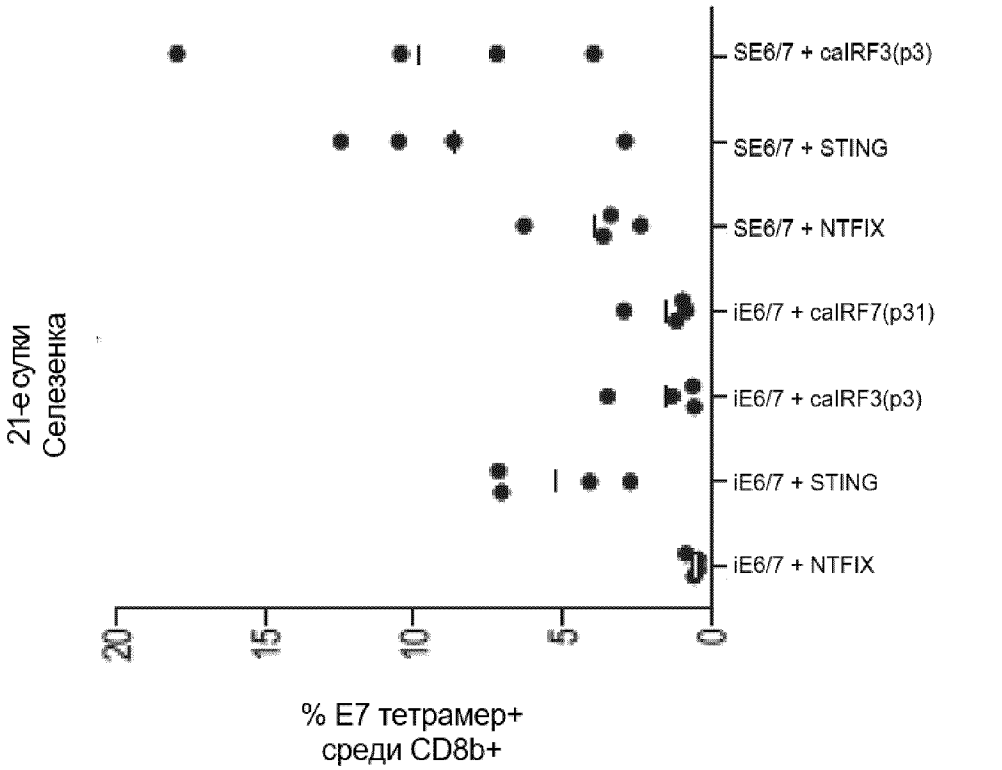

ФИГ. 14B



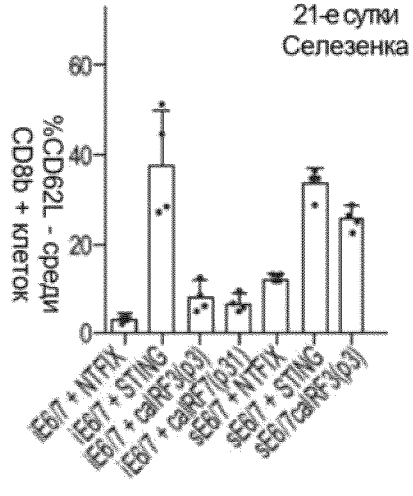

ФИГ. 14A



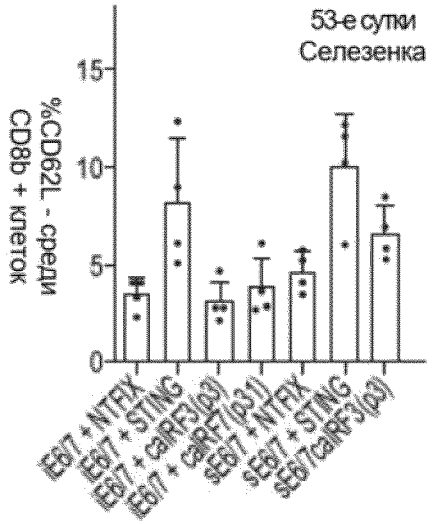

ФИГ. 15B



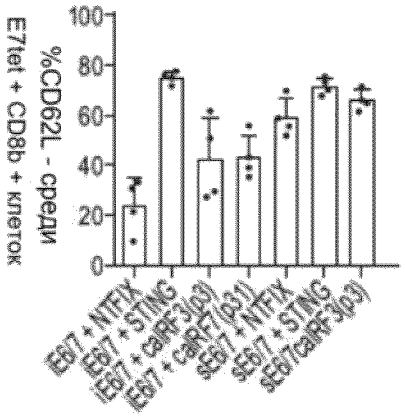

ФИГ. 15A



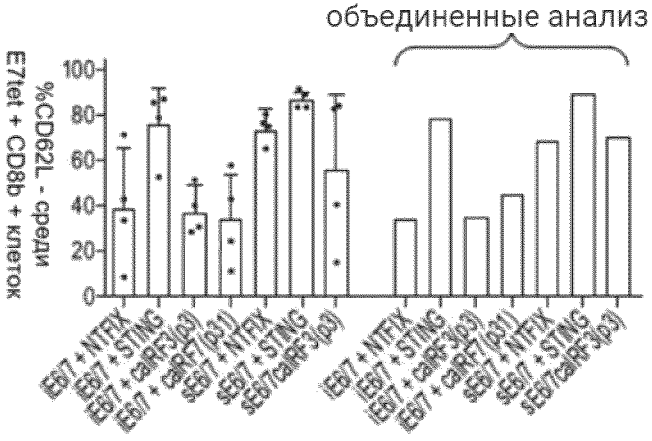

ФИГ. 16A



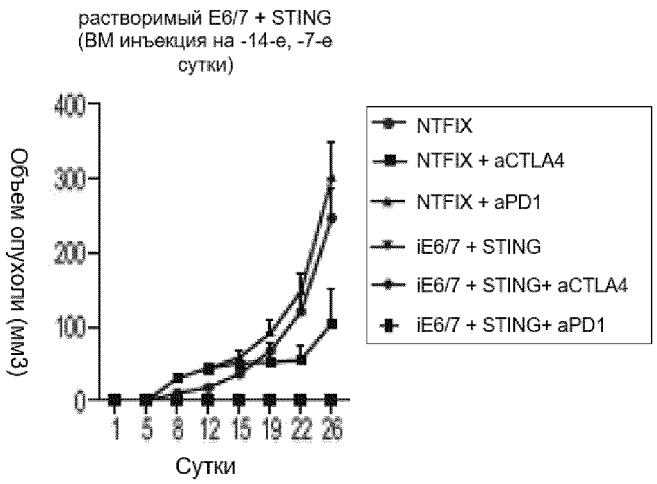

ФИГ. 16B



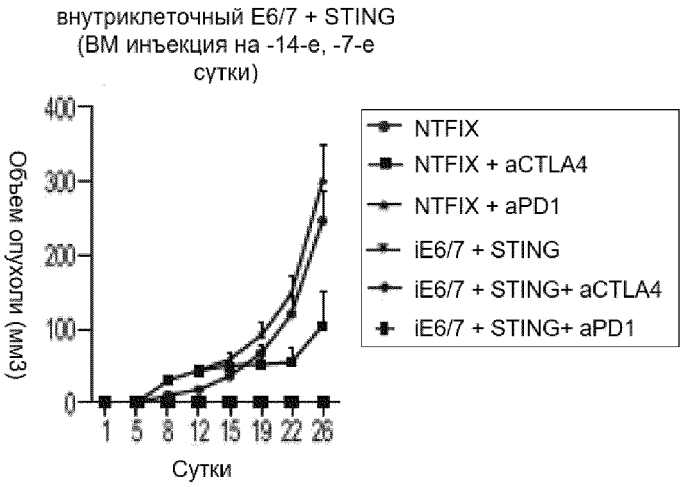

ФИГ. 16C



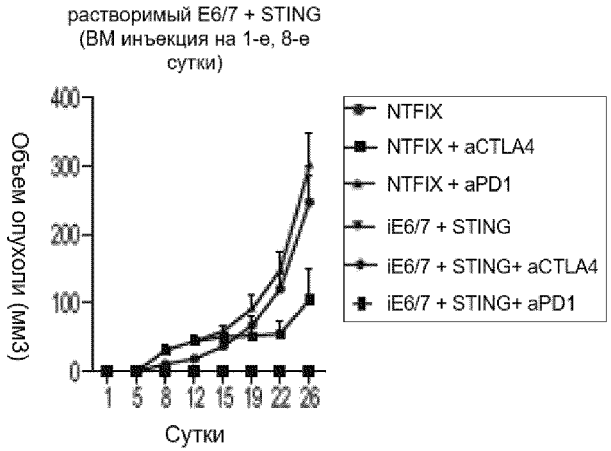

ФИГ. 16D



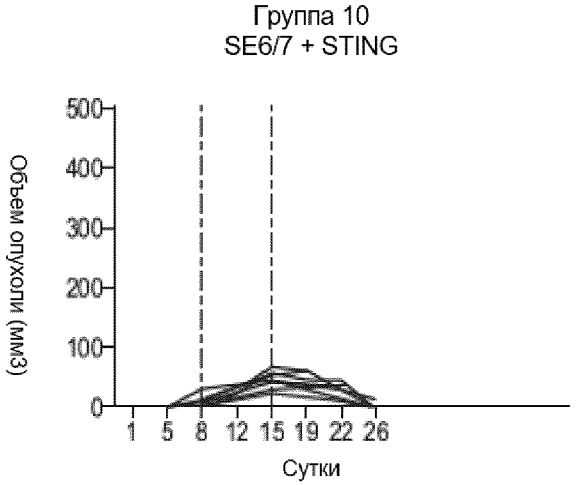

ФИГ. 17A



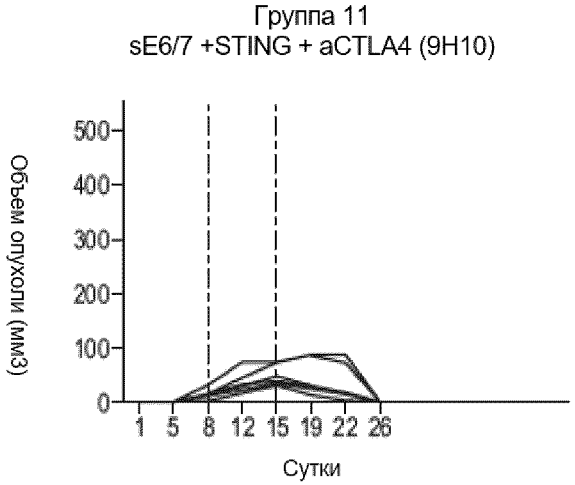

ФИГ. 17B



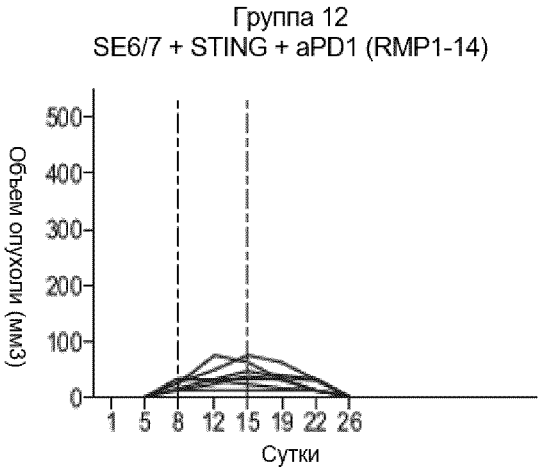

ФИГ. 17C




ФИГ. 18A

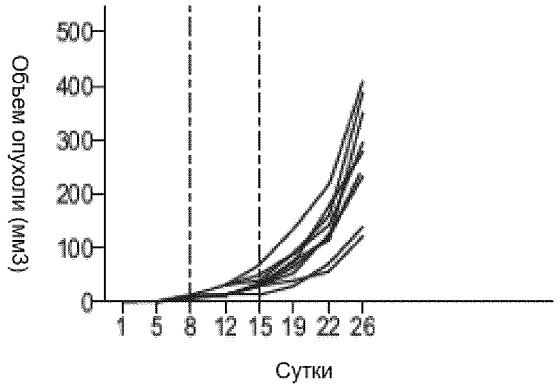



ФИГ. 18B



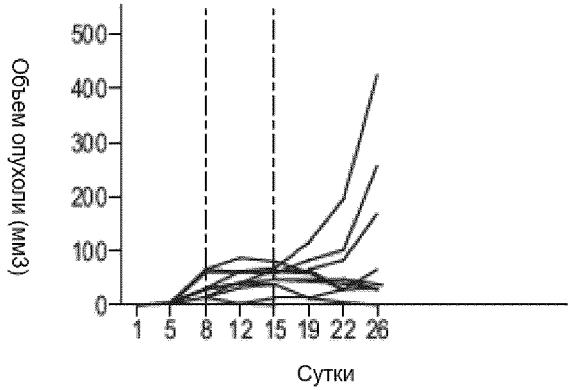

ФИГ. 18C

Группа 13
NTFIX



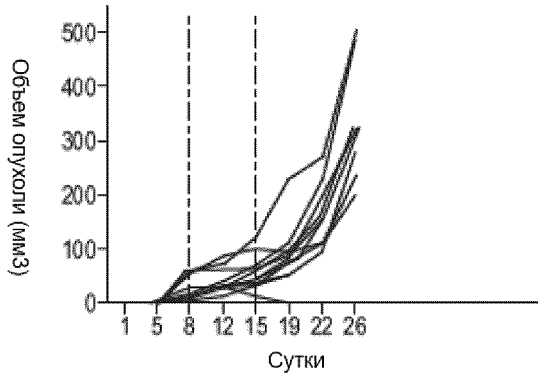

ФИГ. 18D

Группа 14
NTFIX + aCTLA4 (9H10)

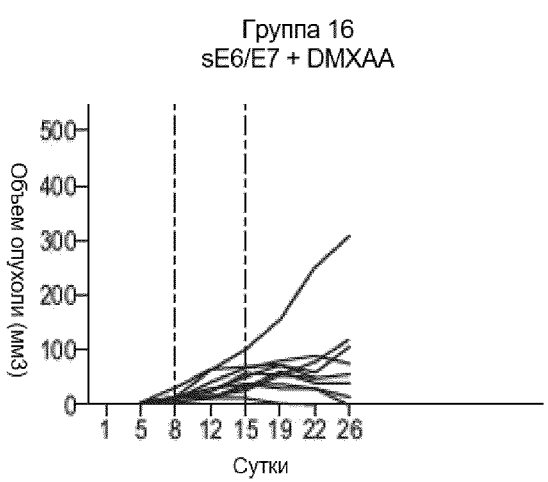



ФИГ. 18E

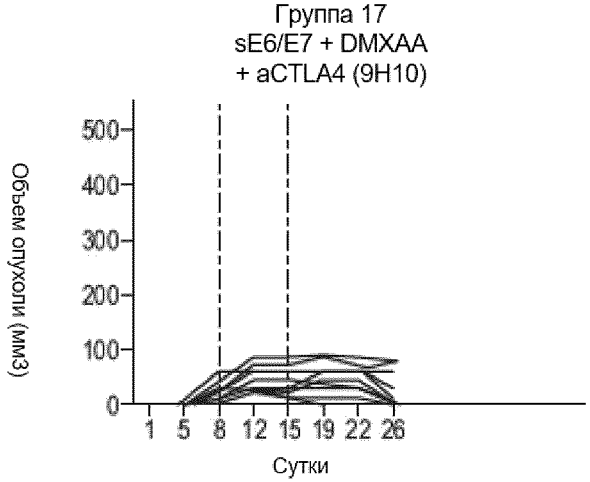
Группа 15
NTFIX + aPD1 (RMP1-14)



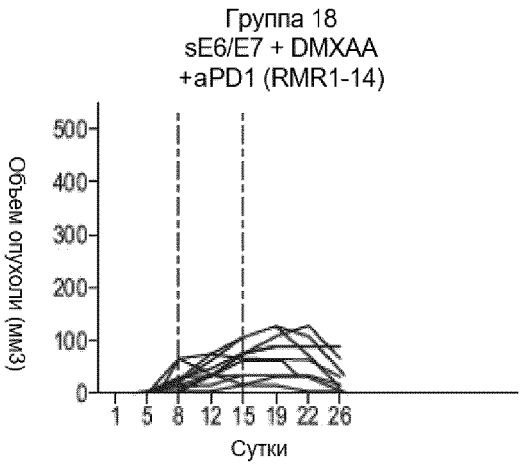

ФИГ. 18F



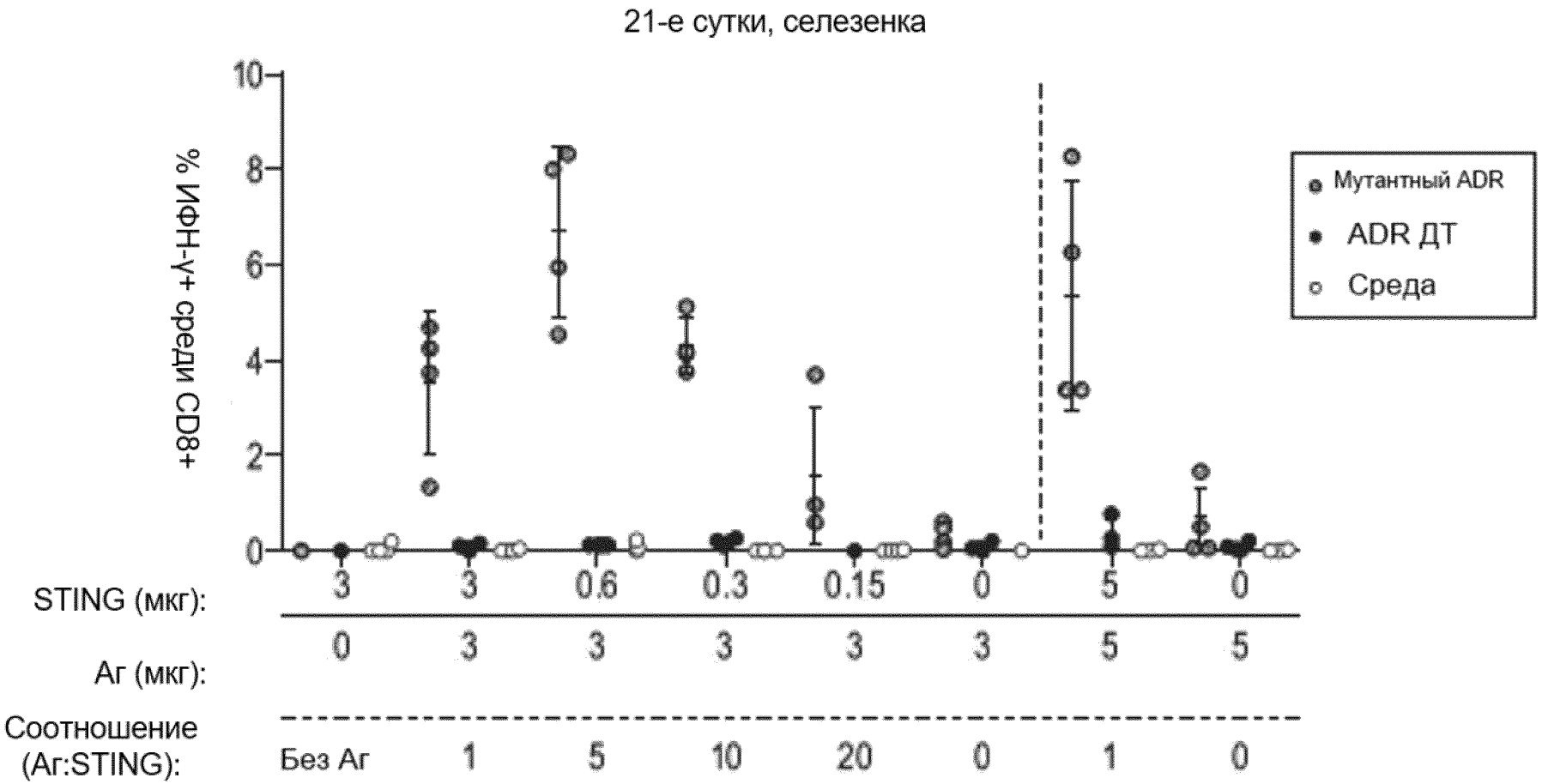

ФИГ. 18G



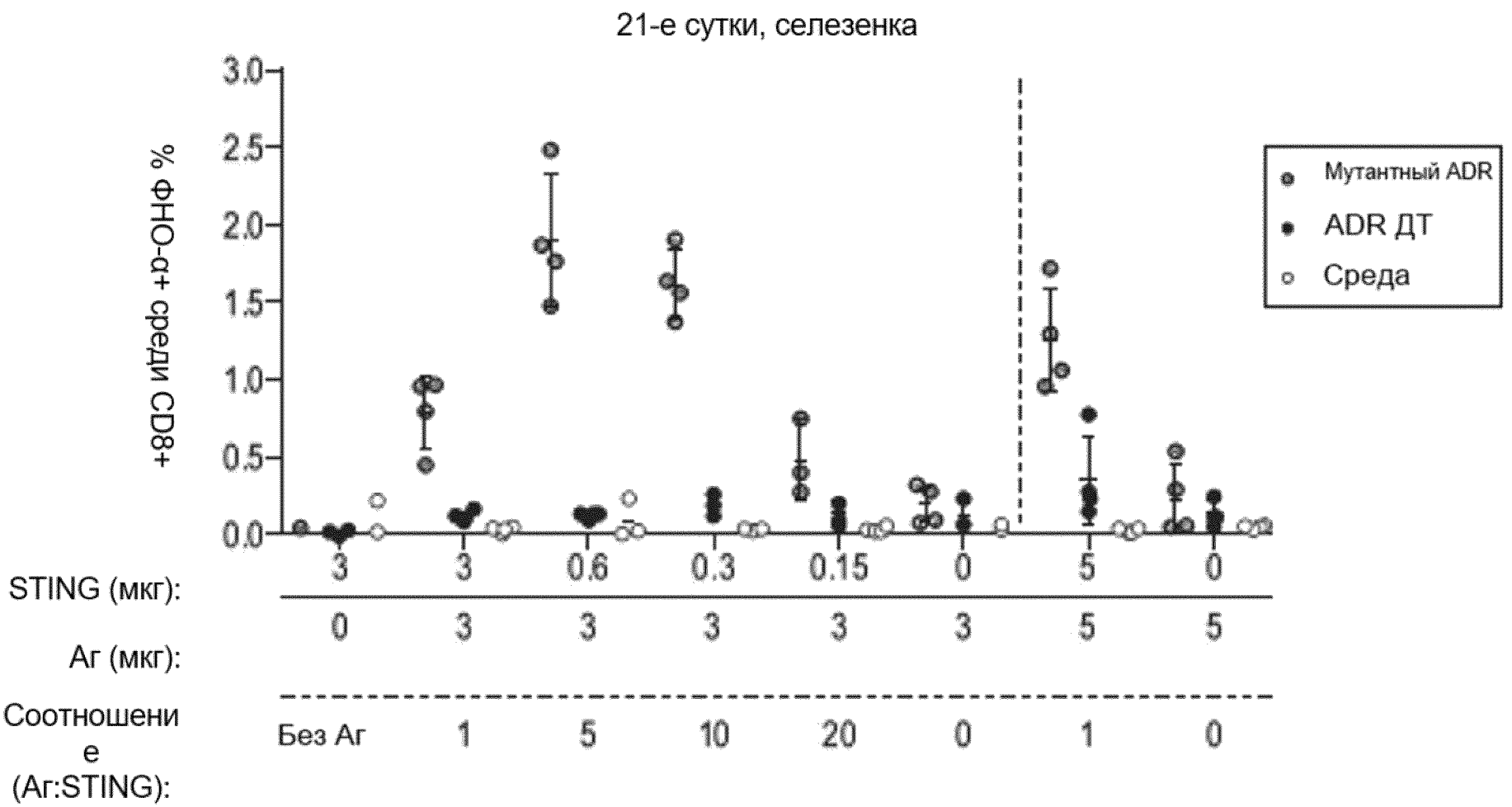

ФИГ. 18H




ФИГ. 18I

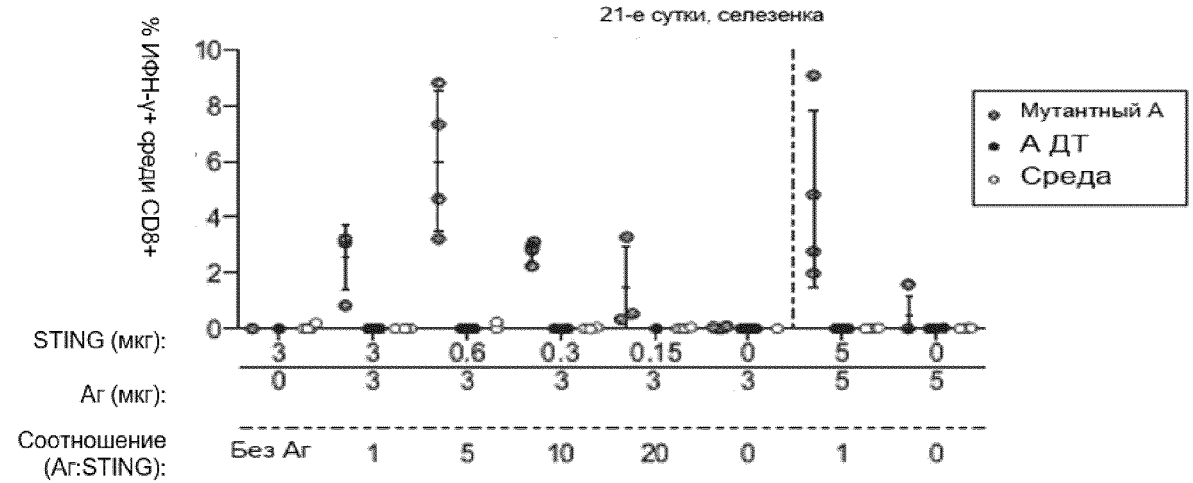

21-е сутки, селезенка
% ИФН-γ+ среди CD8+
10
8
6
4
2
0
Мутантный ADR
ADR ДТ
Среда
STING (мкг):
3 3 0.6 0.3 0.15 0 5 0
Аг (мкг):
0 3 3 3 3 3 5 5
Соотношение (Аг:STING):
Без Аг 1 5 10 20 0 1 0

ФИГ. 19

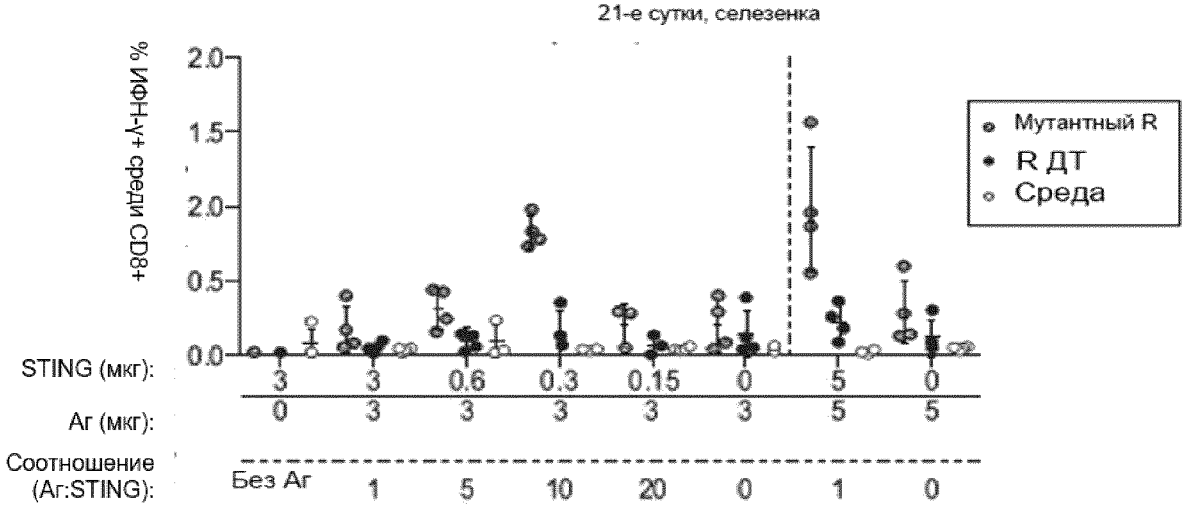

21-е сутки, селезенка
% ФНО-α+ среди CD8+
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Мутантный ADR
ADR ДТ
Среда
STING (мкг):
Аг (мкг):
Соотношение (Аг:STING):
3 3 0,6 0,3 0,15 0 5 0
0 3 3 3 3 3 5 5
Без Аг 1 5 10 20 0 1 0

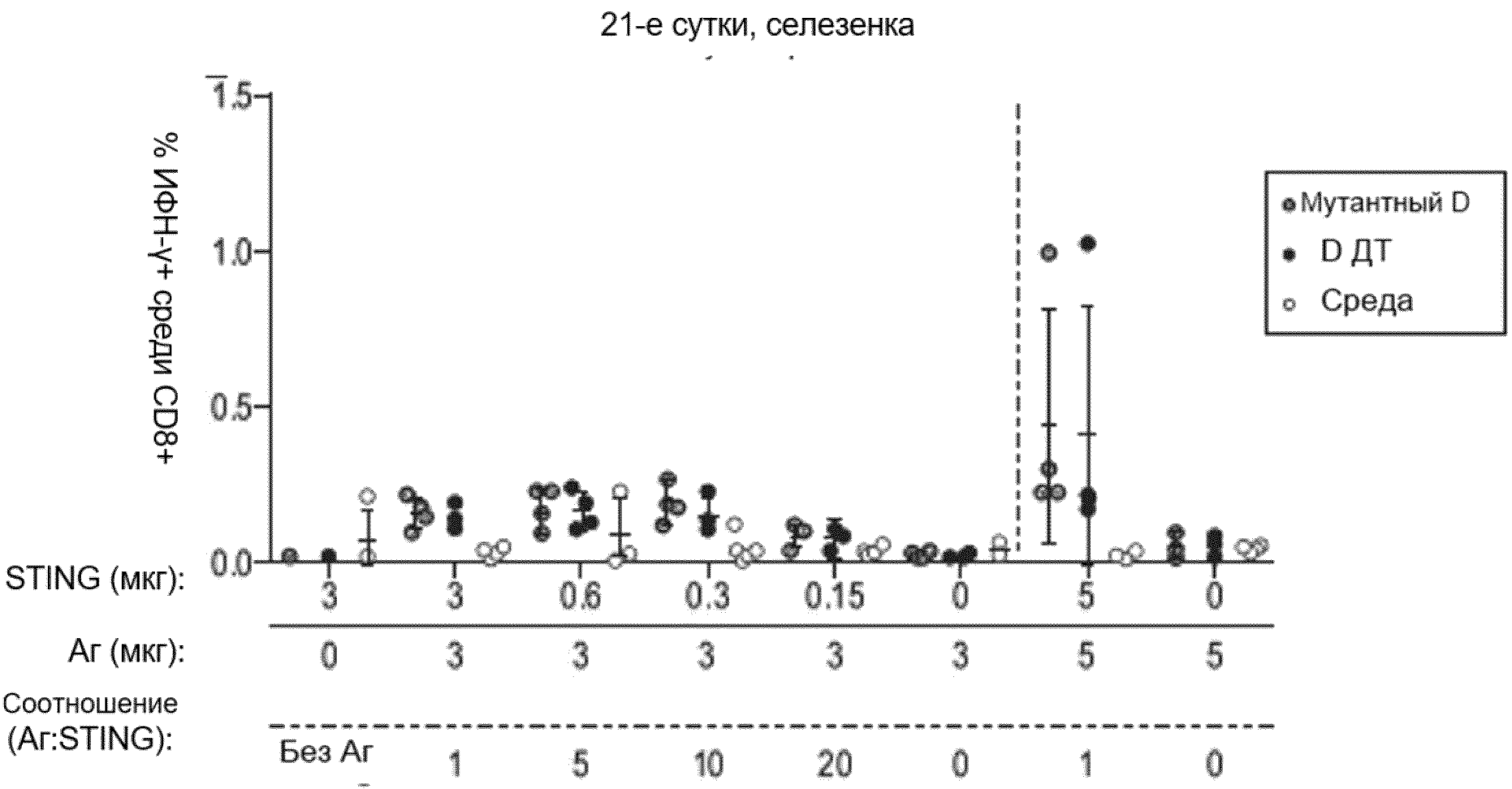
ФИГ. 20

ФИГ. 21A



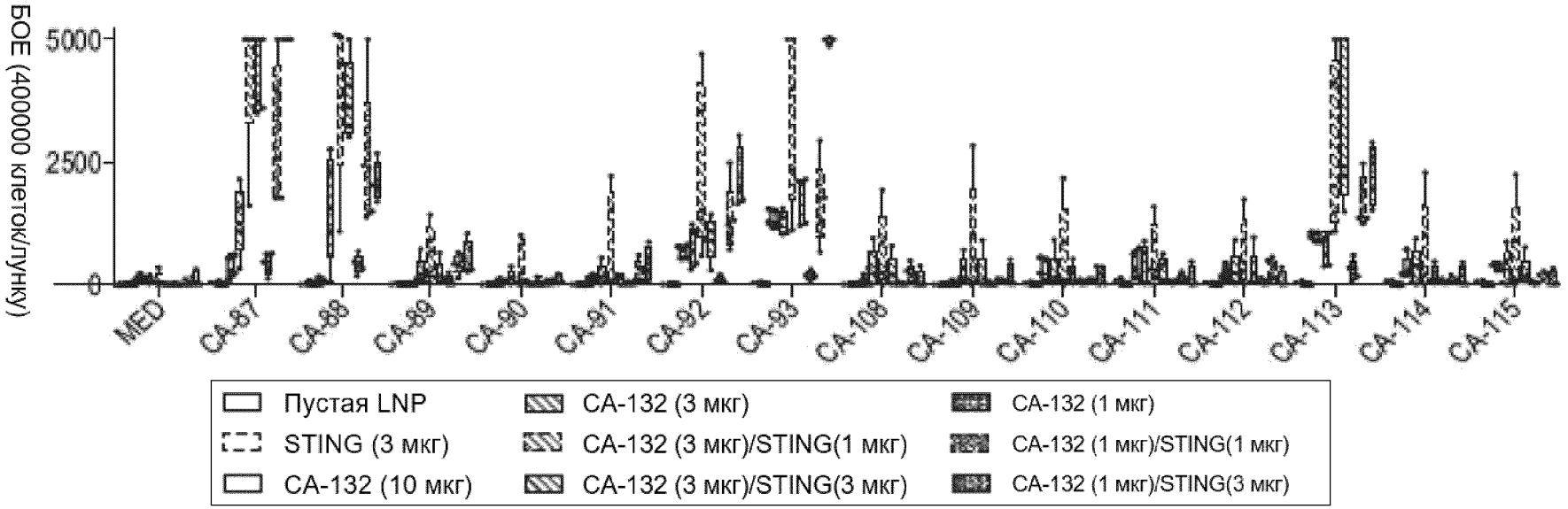

ФИГ. 21B



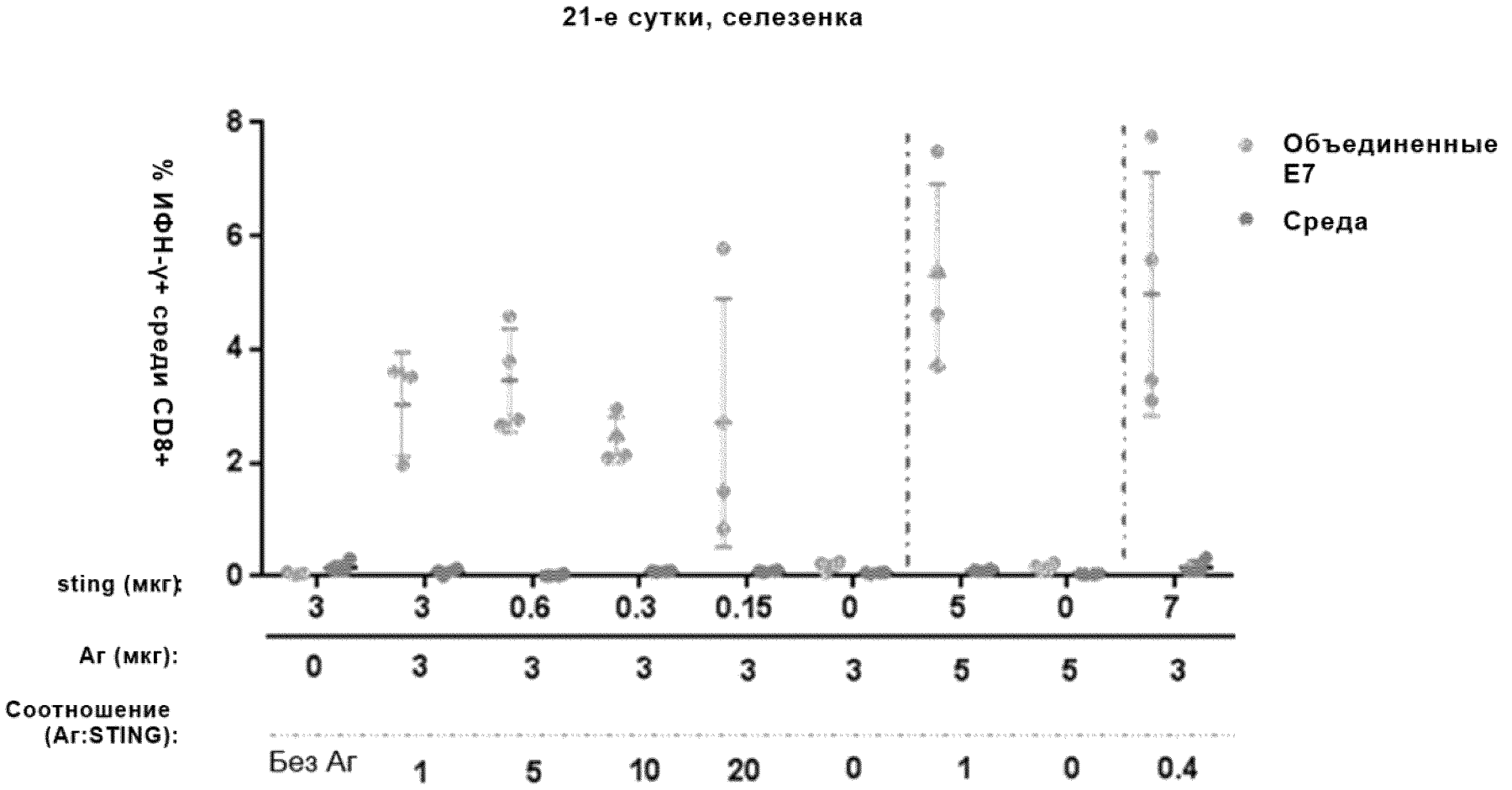

21-е сутки, селезенка
% ИФН-γ+ среди CD8+
1.5
1.0
0.5
0.0
Мутантный D
D ДТ
Среда
STING (мкг):
3
3
0.6
0.3
0.15
0
5
0
Аг (мкг):
0
3
3
3
3
3
5
5
Соотношение (Аг:STING):
Без Аг
1
5
10
20
0
1
0

ФИГ. 21C

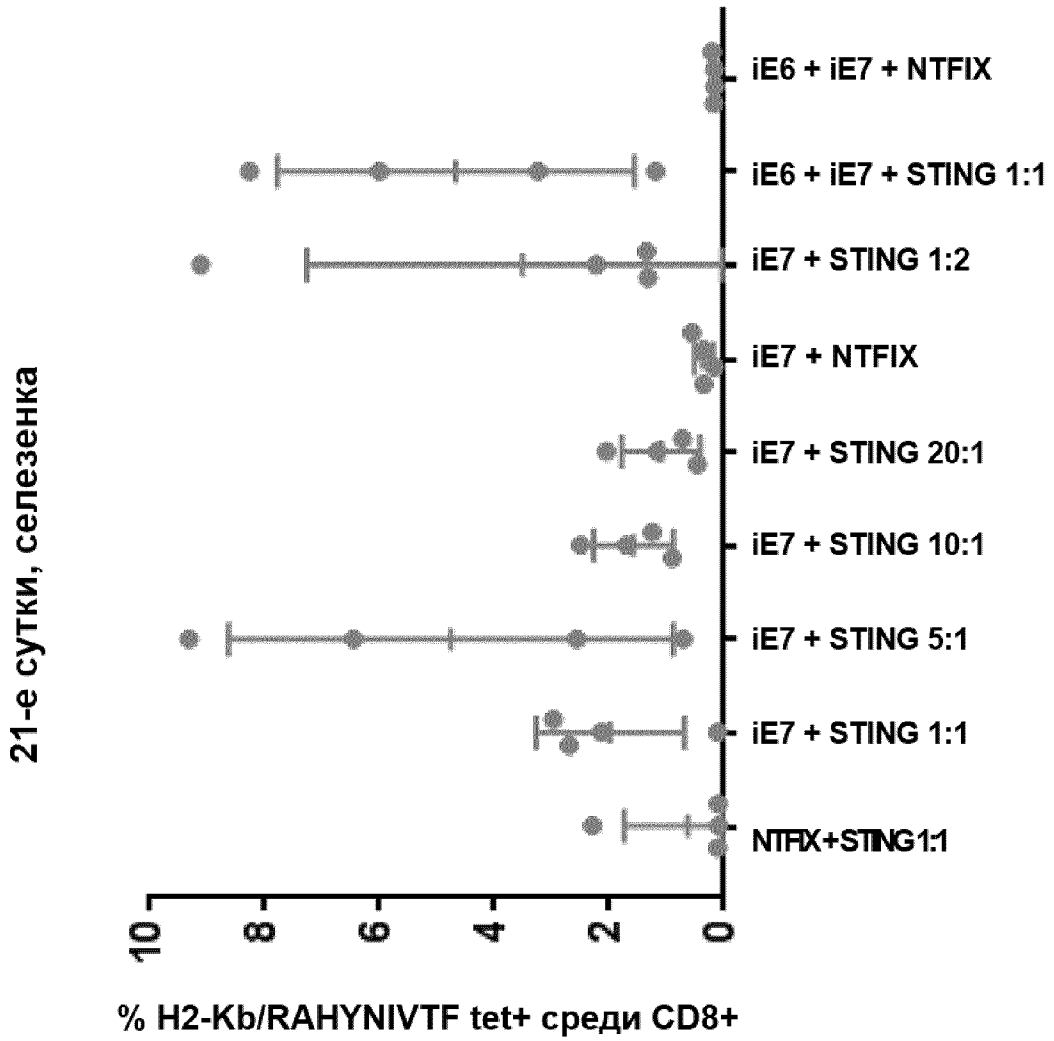
Класс 1



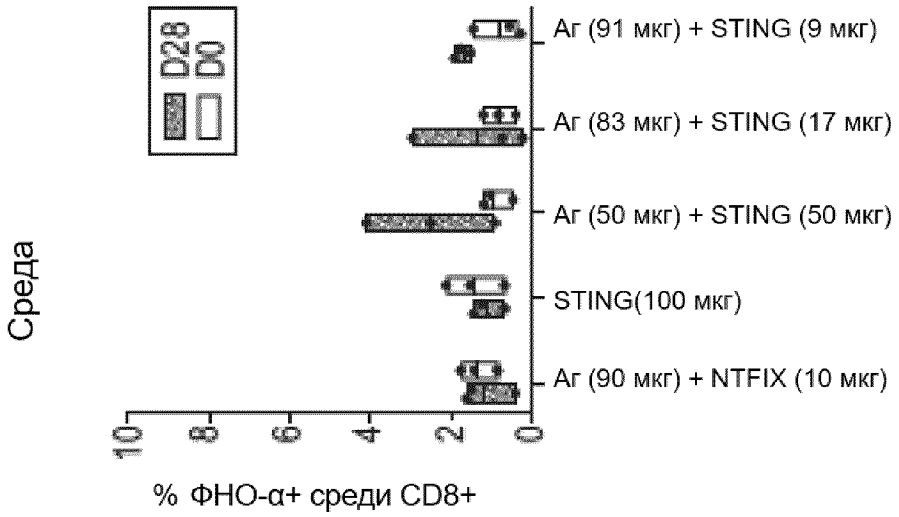

ФИГ. 22


21-е сутки, селезенка
% ИФН-γ+ среди CD8+
8
6
4
2
0
Объединенные E7
Среда
sting (мкг):
3 3 0.6 0.3 0.15 0 5 0 7
Аг (мкг):
0 3 3 3 3 3 5 5 3
Соотношение (Аг:STING):
Без Аг 1 5 10 20 0 1 0 0.4

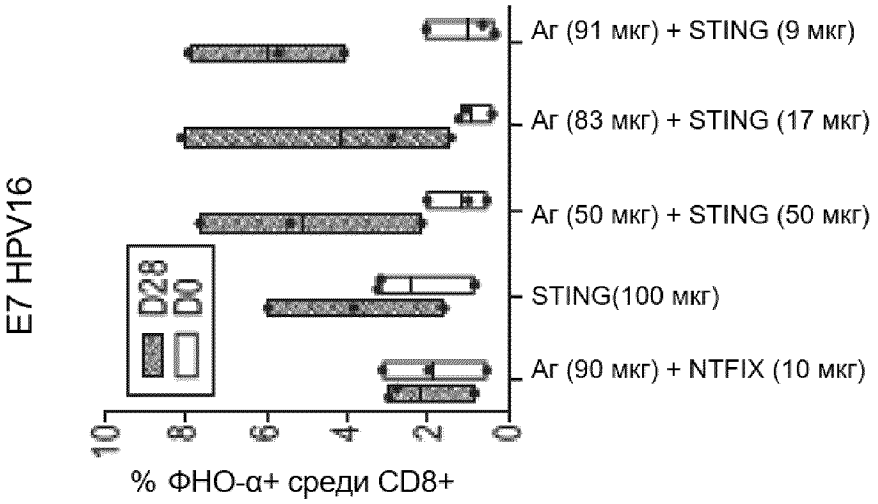
ФИГ. 23А


21-е сутки, селезенка
iE6 + iE7 + NTFIX
iE6 + iE7 + STING 1:1
iE7 + STING 1:2
iE7 + NTFIX
iE7 + STING 20:1
iE7 + STING 10:1
iE7 + STING 5:1
iE7 + STING 1:1
NTFIX+STING1:1
10
8
6
4
2
0
% H2-Kb/RAHYNIVTF tet+ среди CD8+

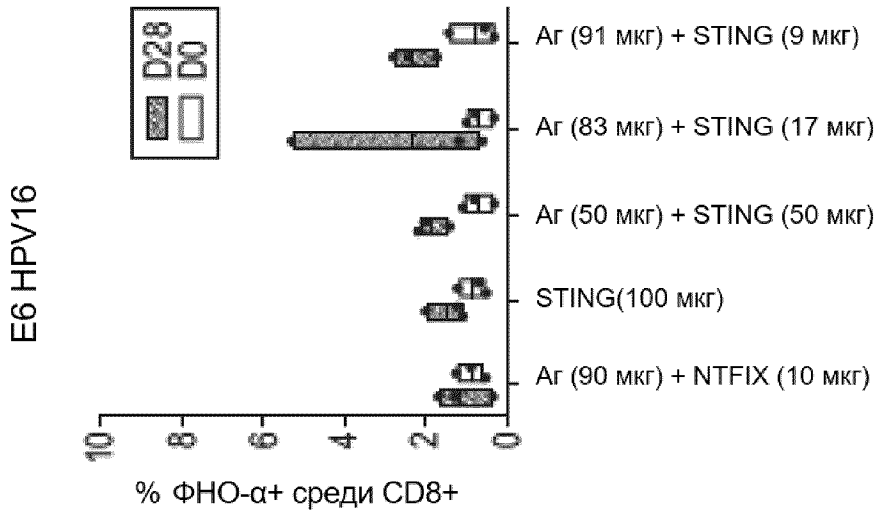
ФИГ. 23В



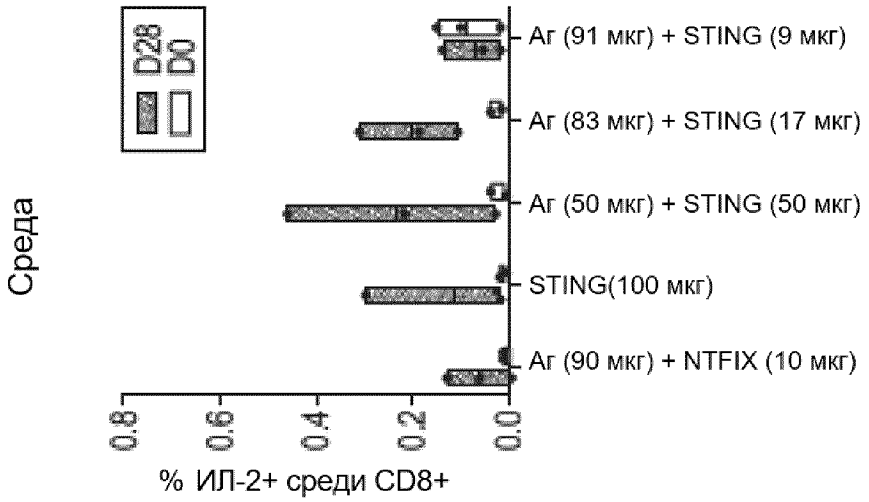

ФИГ. 24C



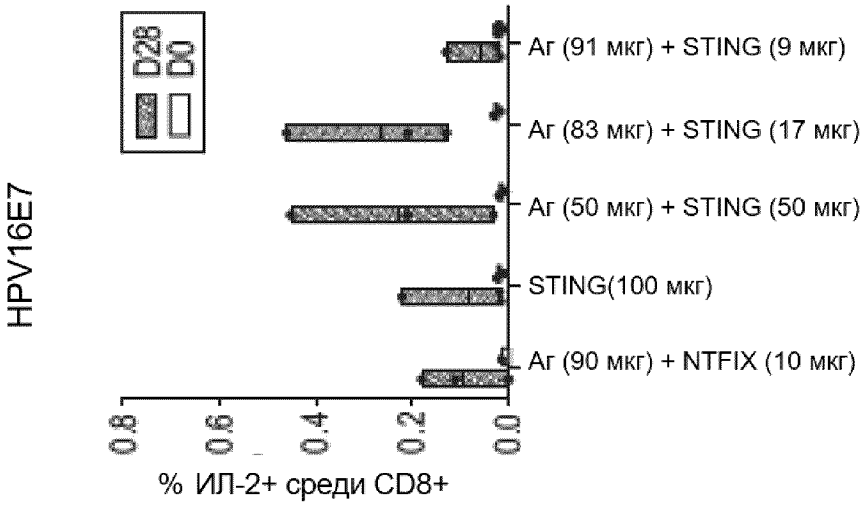

ФИГ. 24B



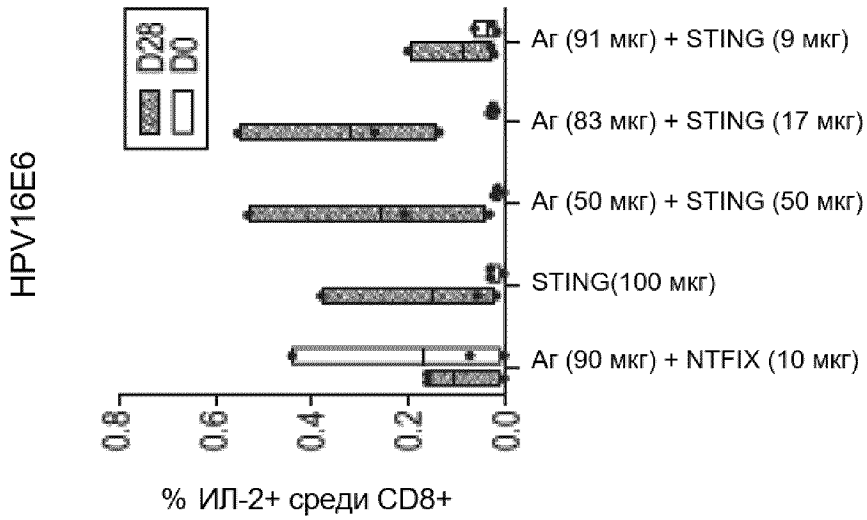

ФИГ. 24A



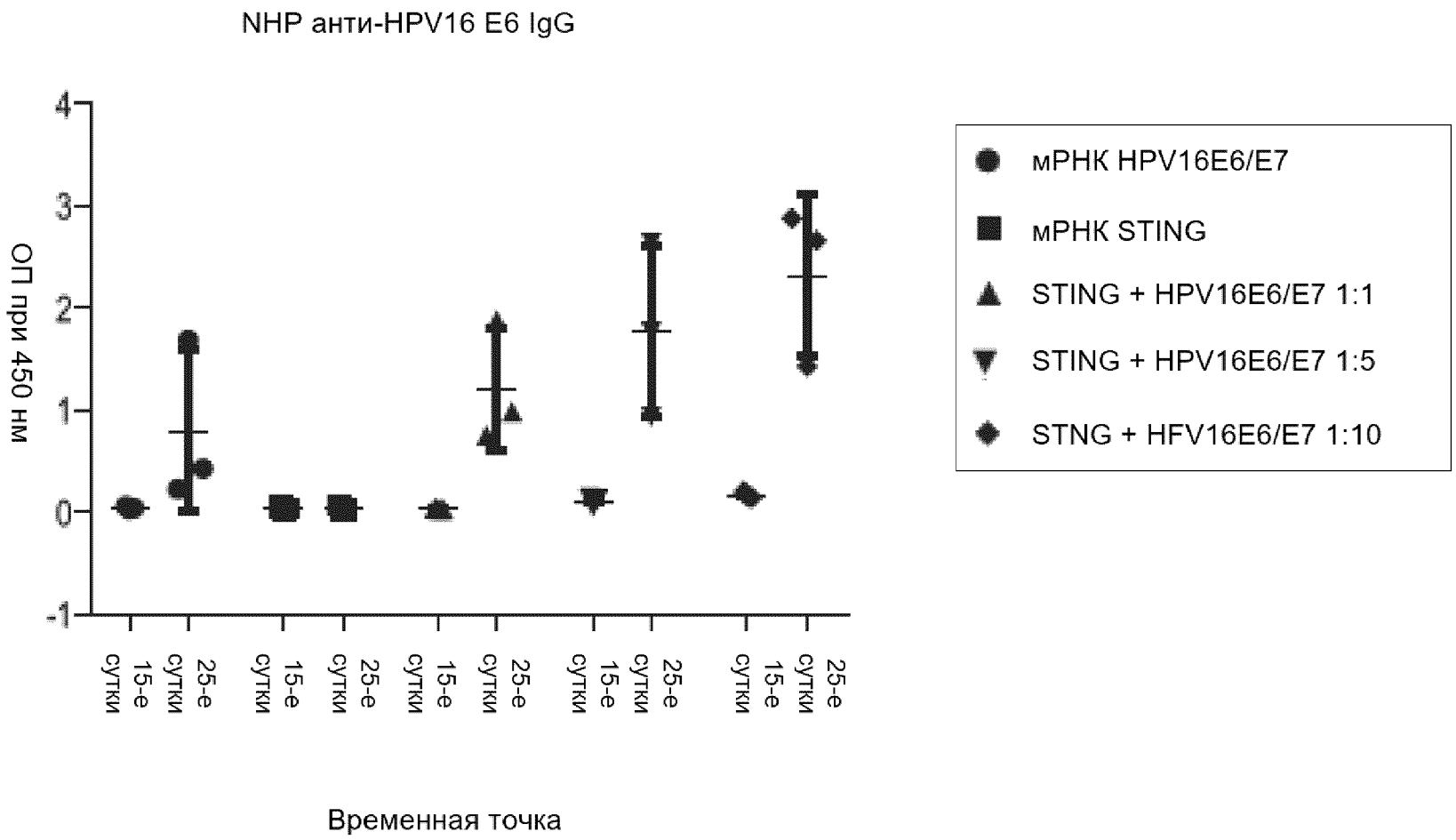

ФИГ. 25C



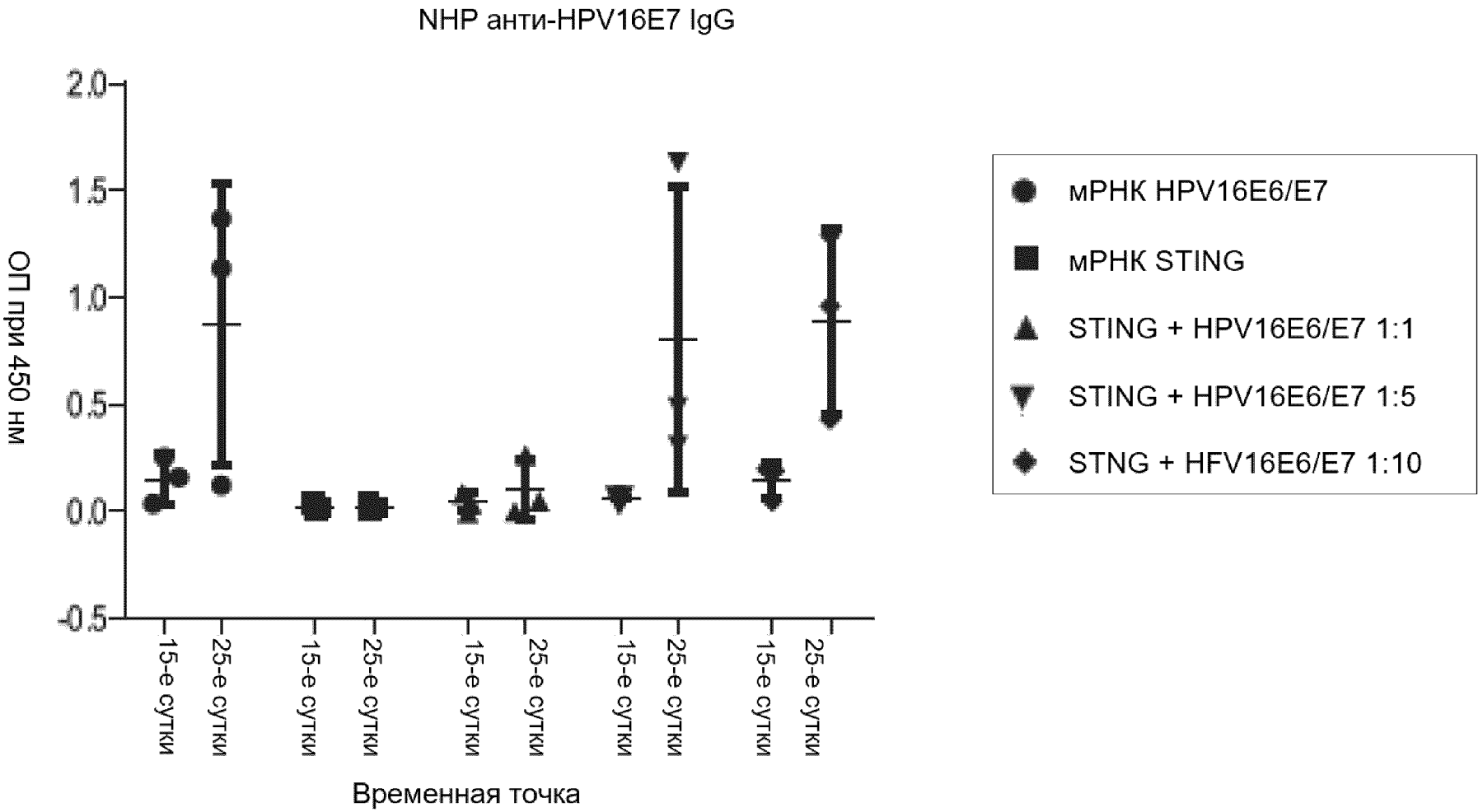

ФИГ. 25B



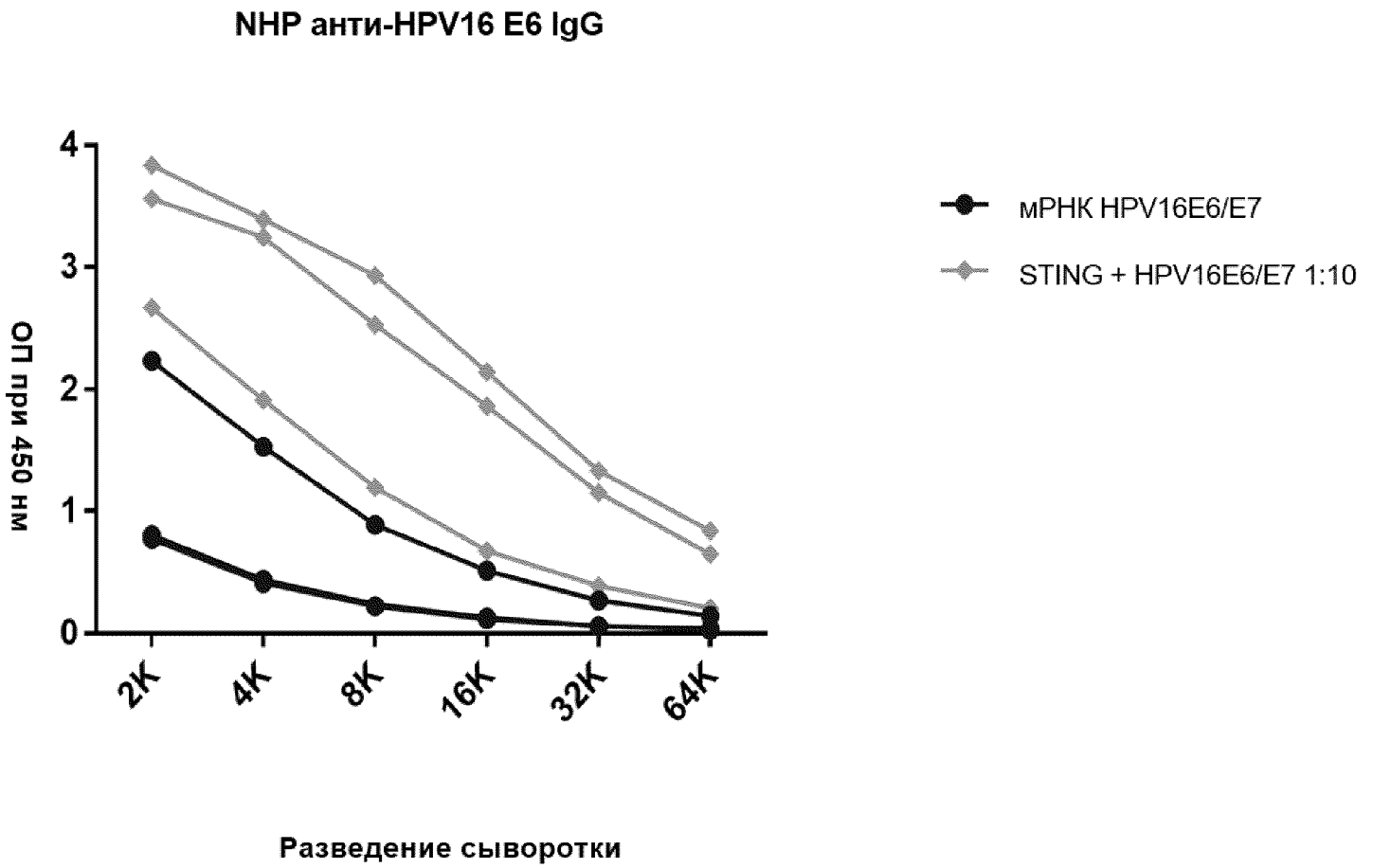

ФИГ. 25A


NHP анти-HPV16 E6 IgG
ОП при 450 нм
4
3
2
1
0
-1
15-е сутки
25-е сутки
Временная точка
мРНК HPV16E6/E7
мРНК STING
STING + HPV16E6/E7 1:1
STING + HPV16E6/E7 1:5
STNG + HFV16E6/E7 1:10

ФИГ. 26

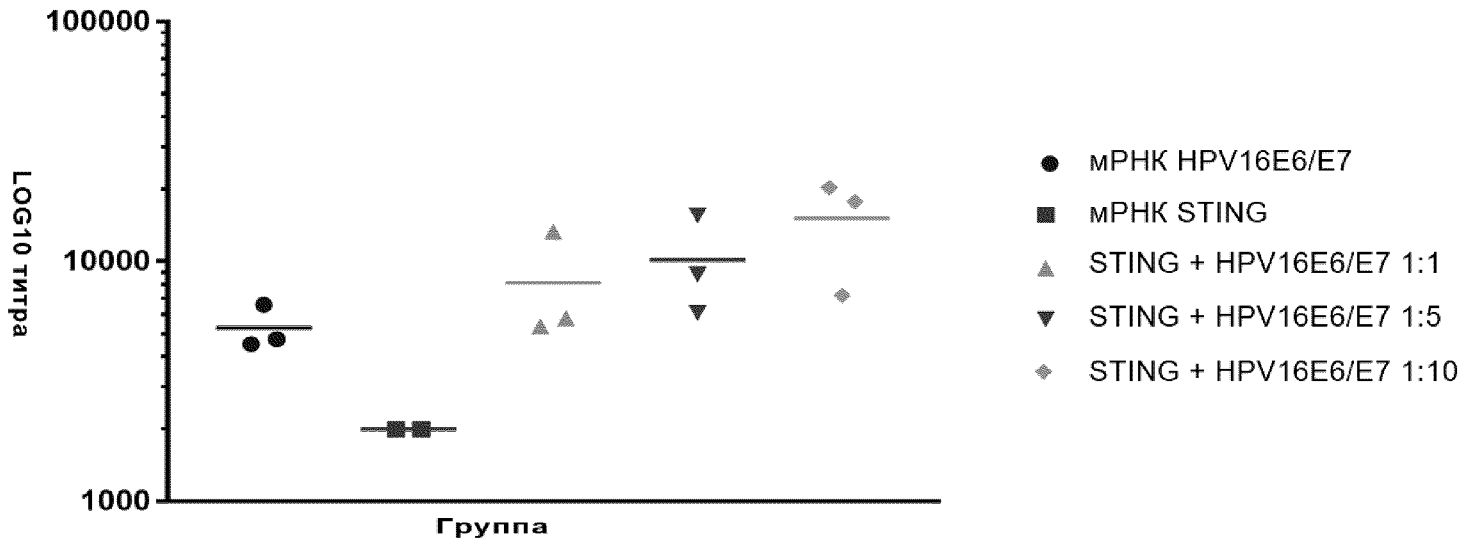

NHP анти-HPV16E7 IgG
ОП при 450 нм
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
15-е сутки
25-е сутки
15-е сутки
25-е сутки
15-е сутки
25-е сутки
15-е сутки
25-е сутки
15-е сутки
25-е сутки
Временная точка
мРНК HPV16E6/E7
мРНК STING
STING + HPV16E6/E7 1:1
STING + HPV16E6/E7 1:5
STNG + HFV16E6/E7 1:10

ФИГ. 27

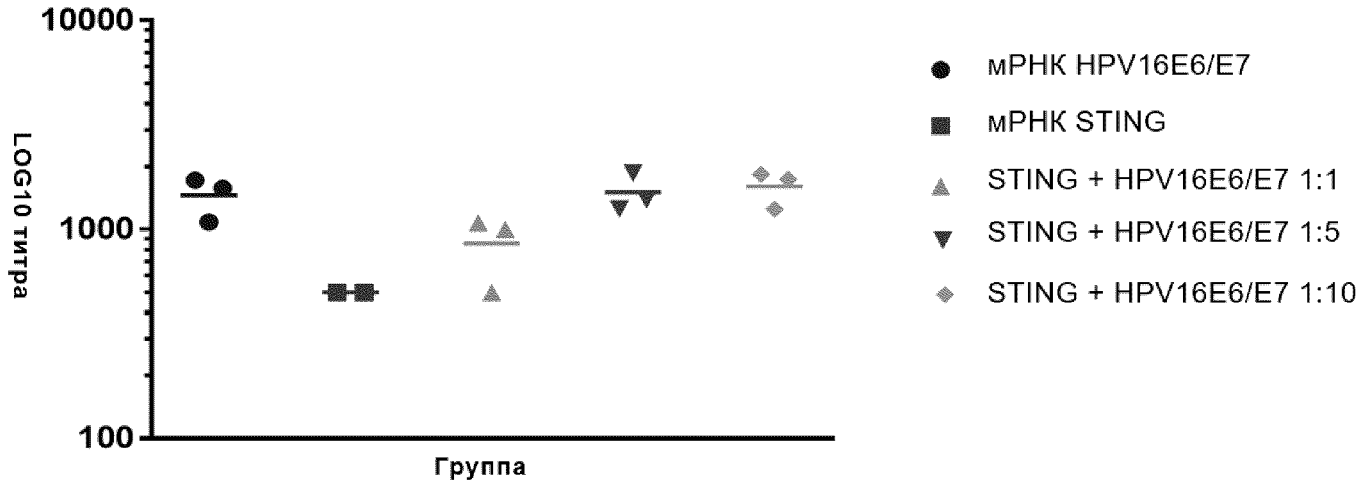

NHP анти-HPV16 E6 IgG
ОП при 450 нм
4
3
2
1
0
2K
4K
8K
16K
32K
64K
Разведение сыворотки
мРНК HPV16E6/E7
STING + HPV16E6/E7 1:10

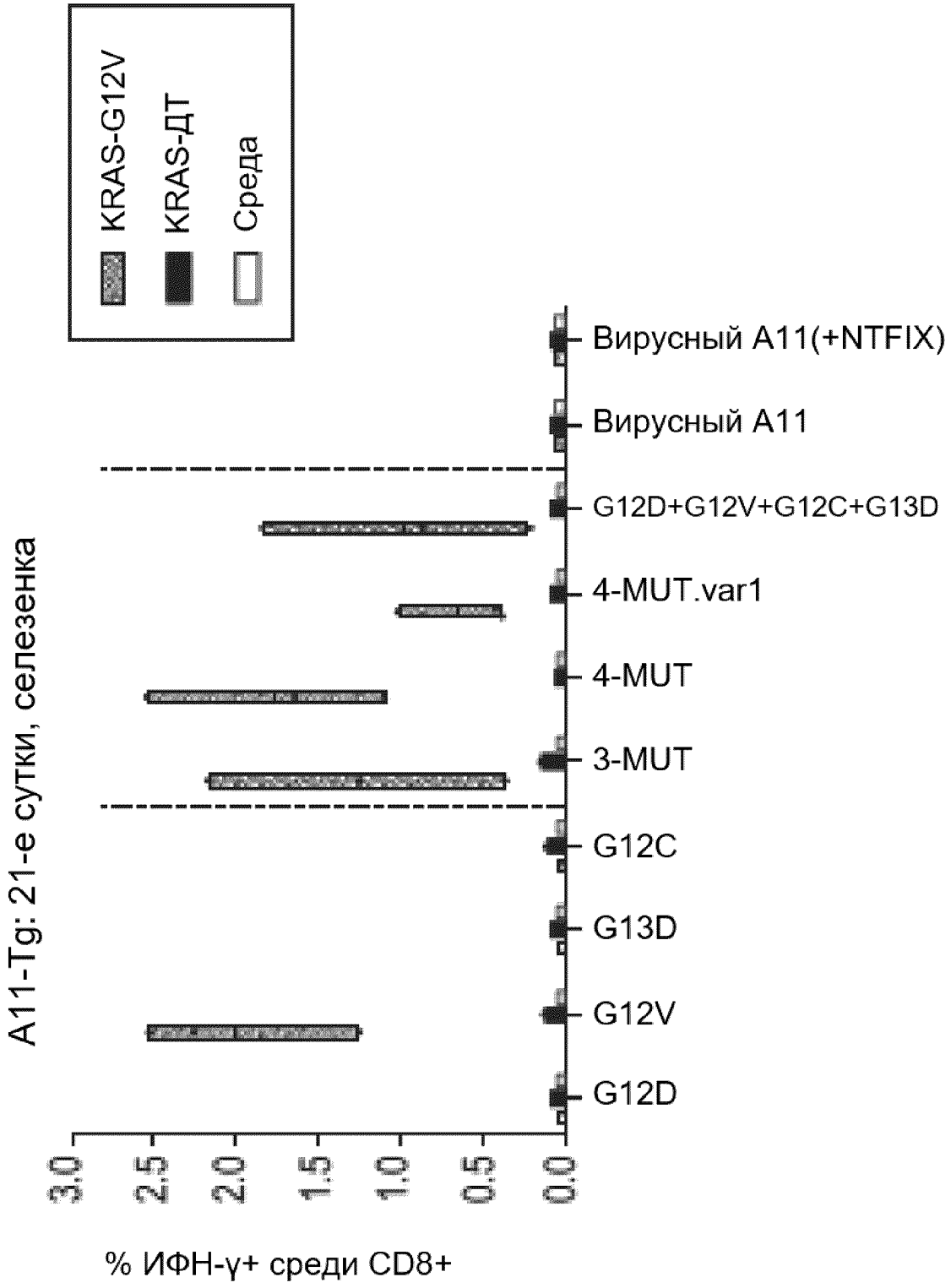
ФИГ. 28

ФИГ. 29A

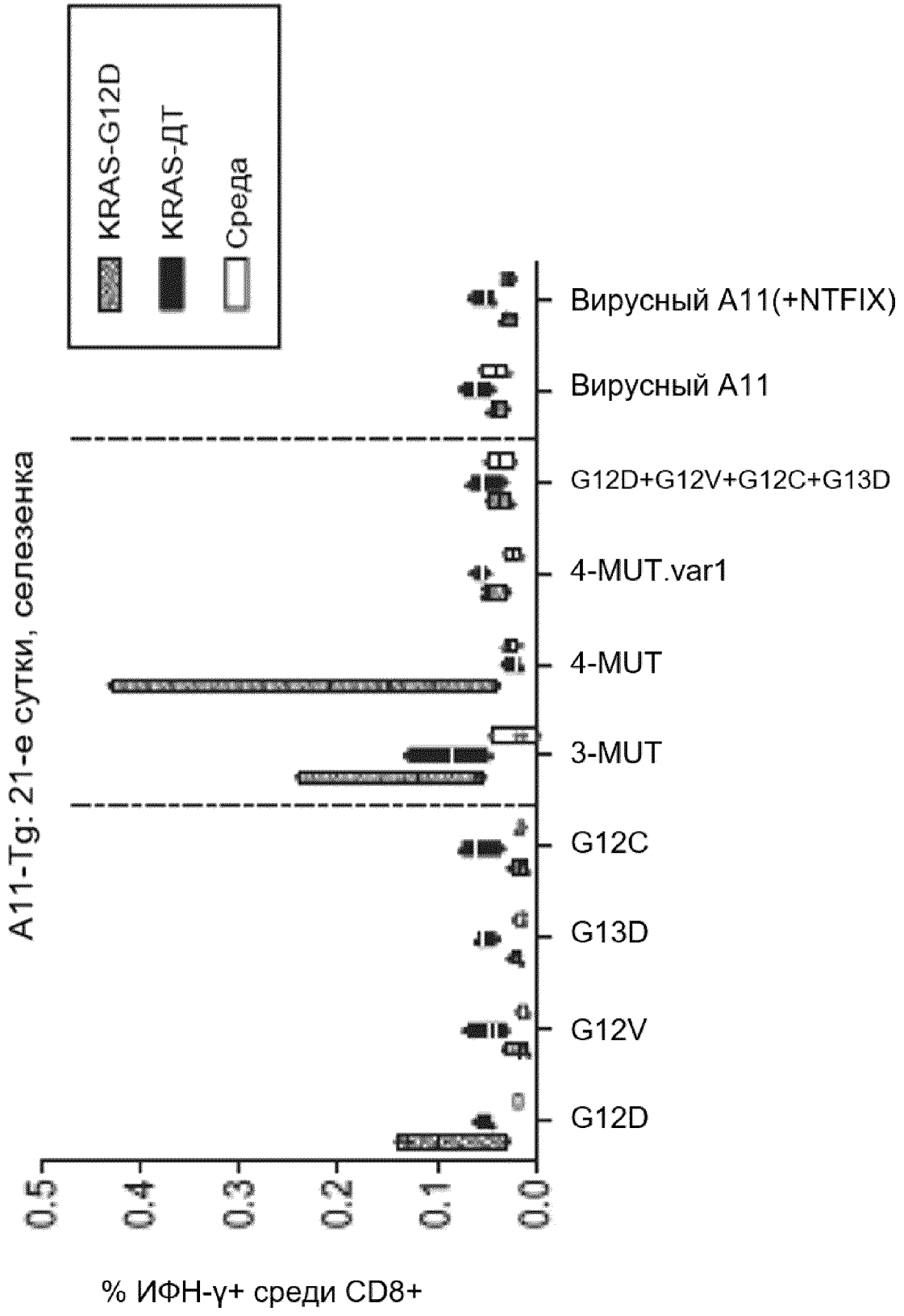



ФИГ. 29B

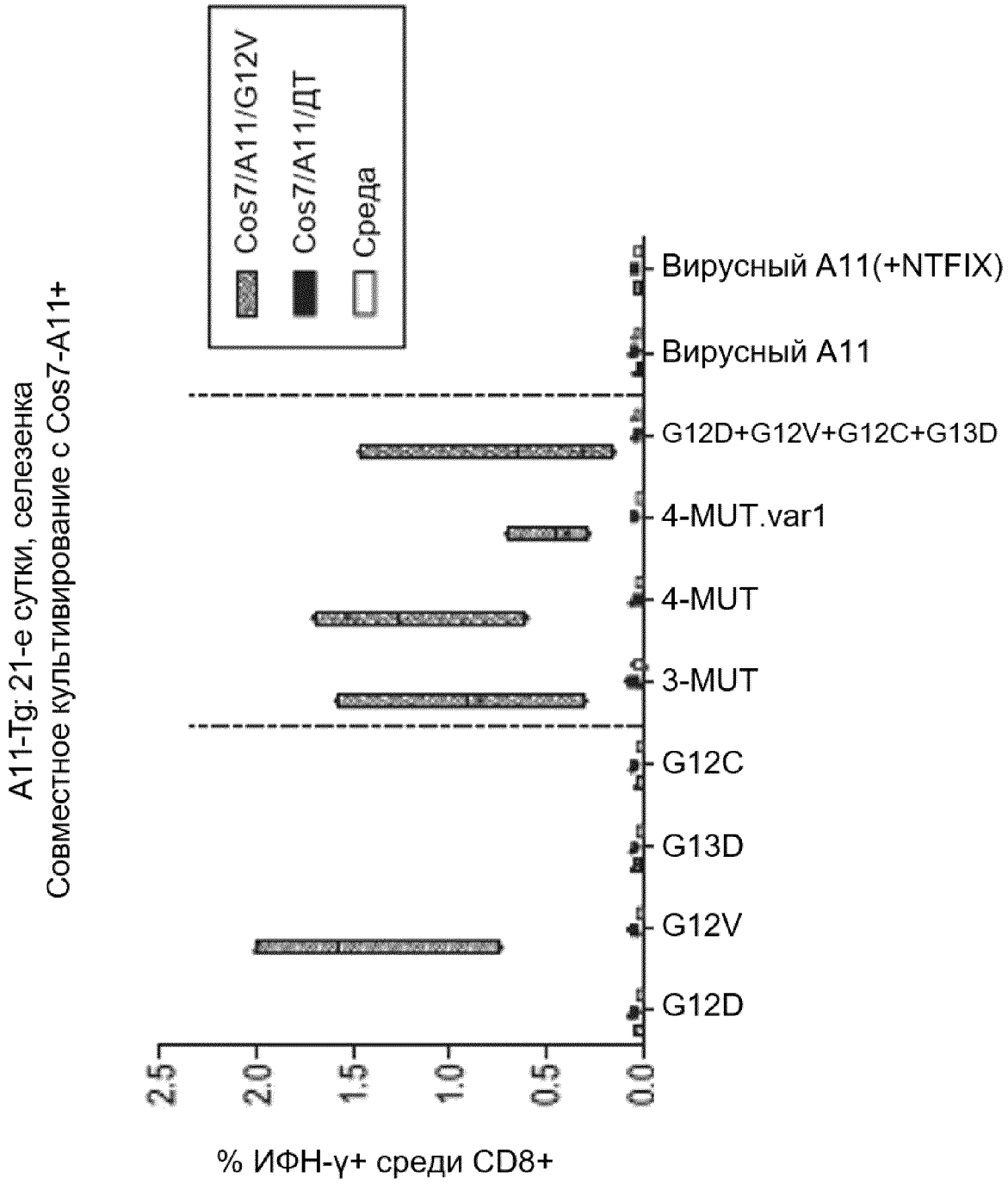



KRAS-G12V
KRAS-ДТ
Среда
Вирусный A11(+NTFIX)
Вирусный A11
G12D+G12V+G12C+G13D
4-MUT.var1
4-MUT
3-MUT
G12C
G13D
G12V
G12D
A11-Tg: 21-е сутки, селезенка
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
% ИФН-γ+ среди CD8+

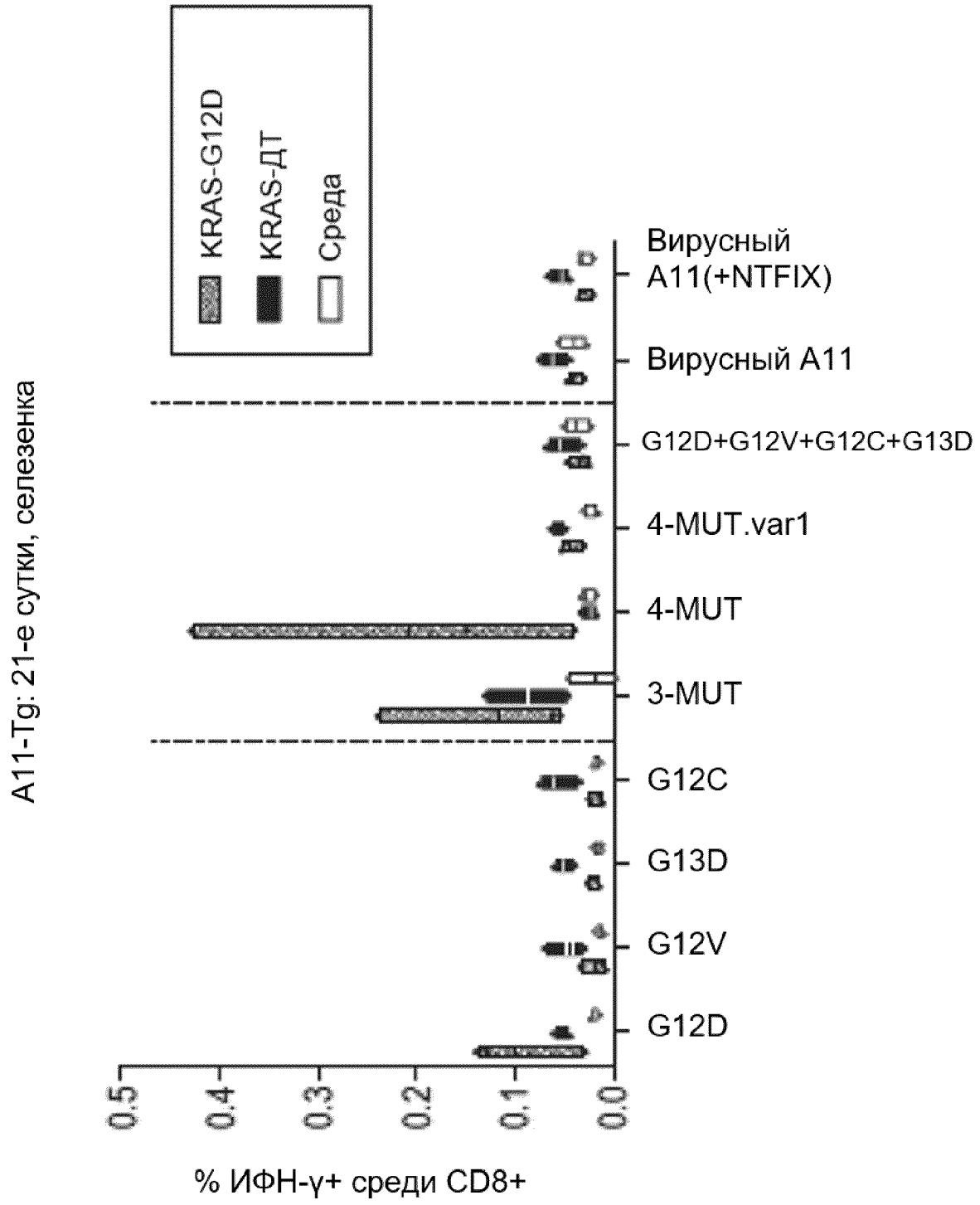
ФИГ. 30


KRAS-G12D
KRAS-ДТ
Среда
A11-Tg: 21-е сутки, селезенка
Вирусный A11(+NTFIX)
Вирусный A11
G12D+G12V+G12C+G13D
4-MUT.var1
4-MUT
3-MUT
G12C
G13D
G12V
G12D
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
% ИФН-γ+ среди CD8+

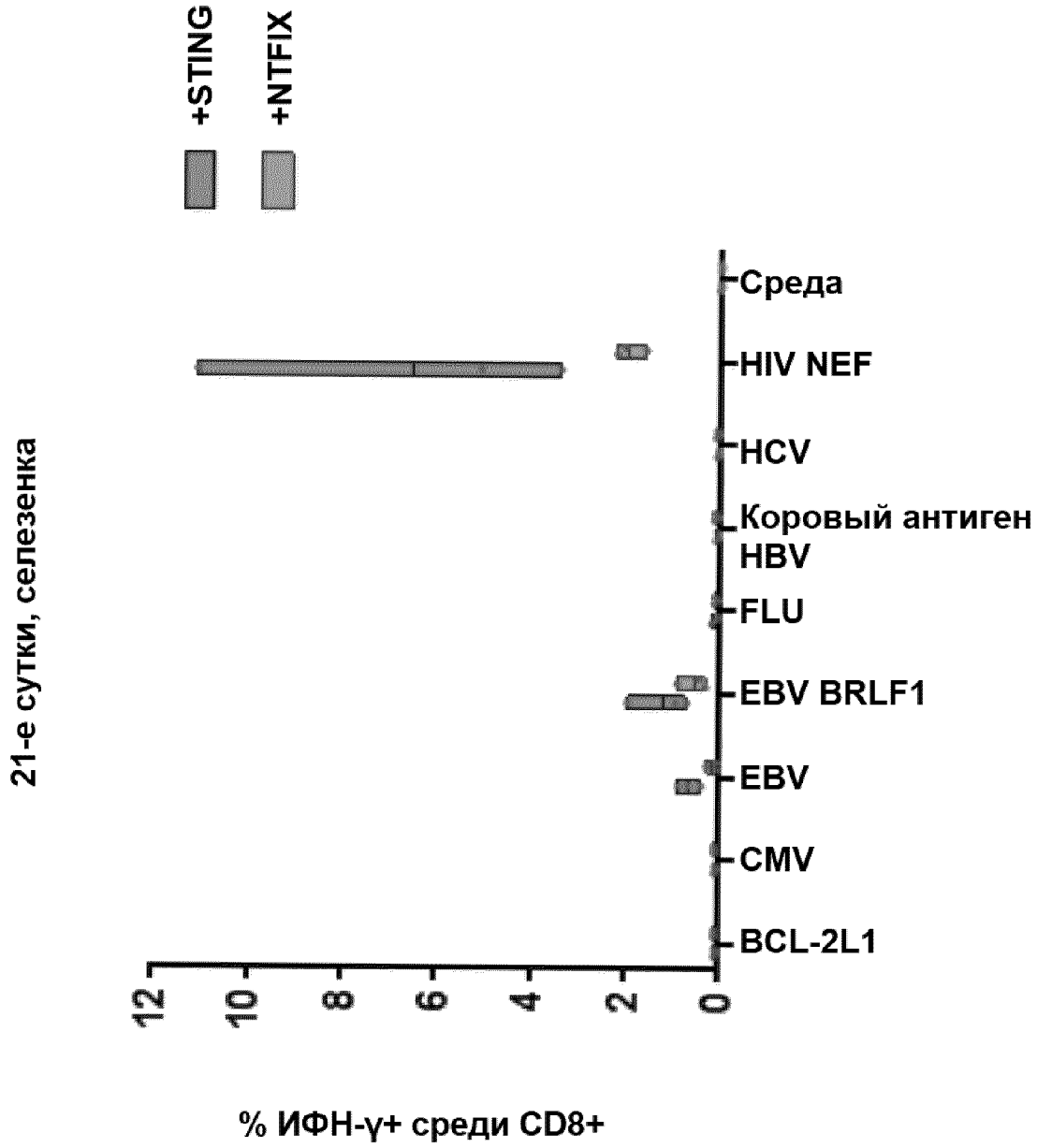
ФИГ. 31


A11-Tg: 21-е сутки, селезенка
Совместное культивирование с Cos7-A11+
Cos7/A11/G12V
Cos7/A11/ДТ
Среда
Вирусный A11(+NTFIX)
Вирусный A11
G12D+G12V+G12C+G13D
4-MUT.var1
4-MUT
3-MUT
G12C
G13D
G12V
G12D
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
% ИФН-γ+ среди CD8+

ФИГ. 32


KRAS-G12D
KRAS-ДТ
Среда
Вирусный A11(+NTFIX)
Вирусный A11
G12D+G12V+G12C+G13D
4-MUT.var1
4-MUT
3-MUT
G12C
G13D
G12V
G12D
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
% ИФН-γ+ среди CD8+
A11-Tg: 21-е сутки, селезенка

ФИГ. 33


+STING
+NTFIX
Среда
HIV NEF
HCV
Коровый антиген
HBV
FLU
EBV BRLF1
EBV
CMV
BCL-2L1
12
10
8
6
4
2
0
% ИФН-γ+ среди CD8+
21-е сутки, селезенка

ФИГ. 34